

NEUGEBORENE NERVENZELLEN NACH KORTIKALER
STREUDEPOLARISIERUNG – FUNKTIONELLE INTEGRATION IN
NEURONALE NETZWERKE MIT VERBINDUNGEN ZUM RÄUMLICHEN
GEDÄCHTNIS

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Falko Braun

geboren am 29.08.1985 in Erfurt

Gutachter *(akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)*

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung	8
1. Einleitung	10
1.1. Neurogenese	10
1.1.1. Adulte Neurogenese	10
1.1.2. Lage und Neuroanatomie des Hippocampus	11
1.1.3. Funktion des Hippocampus.....	12
1.1.4. Adulte Neurogenese im <i>Gyrus dentatus</i>	13
1.1.5. Funktion der adulten Neurogenese im Hippocampus	15
1.1.6. Regulation adulter hippocampaler Neurogenese	17
1.1.7. Interaktion zwischen Hippocampus-abhängigen Lernen und Neurogenese	18
1.1.8. Immediate early genes und Zif268.....	20
1.2. <i>Spreading Depression</i>	21
1.2.1. Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen einer SD	22
1.2.2. Elektrophysiologie einer SD	23
1.2.3. Metabolismus, Hämodynamik und Genexpression	24
1.2.4. CSD und hippocampale Neurogenese.....	25
2. Ziele der Arbeit.....	26
3. Material und Methoden.....	27
3.1. Versuchstiere	27
3.2. Projektdesign	27
3.3. Operative Eingriffe (SD/sham)	30
3.4. Markierung neugeborener Zellen	32

3.5.	Verhaltenstests	33
3.5.1.	Open-Field-Test	33
3.5.2.	Location novelty recognition-Test	34
3.5.3.	Object-Novelty-Recognition-Test	34
3.5.4.	Morris water maze	35
3.6.	Histologie	37
3.6.1.	Perfusion der Tiere und Gewebepräparation	37
3.6.2.	Immunfluoreszenz-Färbung	37
3.6.3.	Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung	39
3.6.4.	Statistik zur Histologie	40
4.	Ergebnisse	42
4.1.	Neuronale Differenzierung IdU ⁺ -Zellen	42
4.1.1.	Einfluss von CSD auf die neuronale Differenzierung in lernenden Tieren (Gruppen mit Verhaltenstests)	42
4.1.2.	Einfluss von CSD auf die neuronale Differenzierung unter Baseline- Bedingungen (Gruppen ohne Verhaltenstests)	43
4.1.3.	Einfluss der Verhaltenstests auf die neuronale Differenzierung in SD und sham-Tieren (Gruppen mit Verhaltenstest vs. Gruppen ohne Verhaltenstest)	46
4.2.	Funktionelle Integration neugebildeter Nervenzellen	47
4.2.1.	Einfluss von CSD auf die Rekrutierung neugeborener Neurone beim Abruf räumlicher Gedächtnisinhalte (Gruppen mit Verhaltenstests)	47
4.2.2.	Gruppen ohne Verhaltenstests (Baseline-Aktivität)	48
4.2.3.	Gedächtnisabruf-spezifische Rekrutierung neugeborener Nervenzellen (Gruppen mit Verhaltenstest vs. Gruppen ohne Verhaltenstest)	49
5.	Diskussion	52
5.1.	CSD nehmen keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung von neugeborenen Zellen	52
5.2.	CSD führen zu erhöhter Neurogenese	53

5.3.	Mögliche Mechanismen der CSD-induzierten Steigerung adulter Neurogenese im ipsilateralen <i>Gyrus dentatus</i>	56
5.4.	Einfluss von CSD auf das räumliche Gedächtnis.....	58
5.5.	Neugeborene Nervenzellen nach CSD werden in bestehende neuronale Netzwerke integriert	61
6.	Schlussfolgerung.....	67
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Anhang.....	81
	Tabellenverzeichnis	81
	Abbildungsverzeichnis	82
	Danksagung.....	83
	Tabellarischer Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Ehrenwörtliche Erklärung	84

Abkürzungsverzeichnis

aCSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BM	Barnes maze
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
Ca²⁺	Kalzium
CA	Cornu ammonis
CBF	zerebrale Blutfluss
CldU	5-Chlor-2'-desoxyuridin
CSD	kortikale Streudepolarisierung / cortical spreading depression
ct	<i>control trial</i>
DC	Gleichstrom
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus dentatus
[K⁺]_e	extrazelluläre Kalium-Konzentration
EC	entorhinaler Kortex
ECoG	Elektrokortikogramm
EEG	Elektroenzephalogramm
G1	Gruppe 1
G2	Gruppe 2
G3	Gruppe 3
GABA	γ-Aminobuttersäure
GZ	Granulärzone
IdU	5-Iod-2'-desoxyuridin
IEG	<i>immediate early gene</i>

K⁺	Kalium
SD	Streudepolarisierung / spreading depression
SEM	Standardfehler
SGZ	Subgranulärzone
SVZ	Subventrikulärzone
LNR	Location-Novelty-Recognition-Test
LTP	Langzeitpotenzierung
MW	Mittelwert
MWM	Morris water maze
Na⁺	Natrium
NeuN	neuronales nukleäres Antigen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OF	Open-Field-Test
ONR	Object-Novelty-Recognition-Test
pt	probe trial
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Zif268	<i>zinc finger binding protein clone 268</i>

Zusammenfassung

Seit vielen Jahrzehnten beschäftigt sich die Forschung intensiv mit der Frage, welche Rolle neugeborene Nervenzellen in verschiedenen Arealen des Gehirns spielen. Im *Gyrus dentatus* ist die adulte Neurogenese eng verwoben mit einer Vielzahl von hippocampalen Lern- und Gedächtnisprozessen und zentraler Bestandteil eines komplexen Systems neuronaler Plastizität. Kortikale *spreading depression* (CSD), erstmals 1944 von Aristides Leão beschriebene Epiphänomene neuropathologischer Erkrankungen wie der Migräne oder dem Schlaganfall, ermöglichen einen Einblick in diese Prozesse. Wie in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde, führen CSD neben tiefgreifenden Veränderungen von Genexpression und Struktur der Großhirnrinde auch zu einer massiven Steigerung der hippocampalen Neurogenese.

Diese Arbeit ist Teil eines Projektes, welches erstmals auch in Mäusen nach CSD eine deutlich erhöhte adulte Neurogenese im *Gyrus dentatus* nachweisen konnte. Im Rahmen des übergeordneten Projektes wurden mittels verschiedener Verhaltenstests die Langzeiteffekte von CSD auf hippocampale Plastizität sowie kognitive und psychomotorische Prozesse überprüft (Urbach et al. 2017). Dabei zeigte sich, dass CSD zu komplexen Änderungen im Verhalten der Tiere führen und zumindest bestimmte Formen räumlichen Lernens erleichtern.

Eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob die nach CSD vermehrt nachweisbaren neugeborenen Zellen zu Neuronen ausdifferenzieren. Um den Reifungszustand der neugeborenen Zellen zu bewerten, wurden neben dem Proliferationsmarker IdU der neuronale Marker NeuN mittels Immunfluoreszenzfärbung markiert und ausgewertet. Weiterhin sollte mithilfe des *immediate early gene* Zif268 untersucht werden, in welchem Ausmaß die nach CSD vermehrt nachweisbaren neugeborenen Nervenzellen rekrutiert und funktionell in bestehende neuronale Schaltkreise des *Gyrus dentatus* integriert wurden. Darüber hinaus interessierte uns, welche Interaktionen zwischen der Anzahl integrierter Zellen und hippocampusabhängigen Lernen bestehen.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass CSD keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung neugeborener Zellen im *Gyrus dentatus* nehmen. Zudem demonstrieren unsere Daten, dass die nach CSD deutlich erhöhte

Neurogenese zur Bildung funktionell aktiver Nervenzellen führt, welche innerhalb hippocampaler Lern- und Gedächtnisprozesse rekrutiert werden können.

1. Einleitung

Lange Zeit galt das zentrale Nervensystem als ein fixes Konstrukt, dem man die Fähigkeit absprach, sich nach Abschluss der Entwicklung selbst zu erneuern. Mit Entdeckung der adulten Neurogenese im Jahre 1962 änderte sich dieses Paradigma. Seither beschäftigt sich die Forschung intensiv mit der Frage, welche Rolle neugeborene Nervenzellen in verschiedenen Arealen des Gehirns spielen. Im Hippocampus ist die adulte Neurogenese eng verwoben mit einer Vielzahl von Lern- und Gedächtnisprozessen sowie zentraler Bestandteil eines komplexen Systems neuronaler Plastizität. Einen Einblick in diese Prozesse erlauben kortikale *spreading depressions*, sich wellenförmig ausbreitende elektrische Erregungen. Sie sind Epiphänomene neuropathologischer Prozesse wie der Migräne oder dem Schlaganfall und führen neben tiefgreifenden Veränderungen von Genexpression und Struktur der Großhirnrinde auch zu einer Steigerung der hippocampalen Neurogenese im *Gyrus dentatus* (DG). Inwieweit CSD und die damit verbundene Steigerung neugeborener Zellen im DG Einfluss auf Hippocampus-abhängiges Lernen und Gedächtnis nehmen, wurde bisher nur in wenigen Arbeiten untersucht und war zu Beginn des vorliegenden Projektes nicht im Detail bekannt.

1.1. Neurogenese

1.1.1. Adulte Neurogenese

Die adulte Neurogenese ist ein relativ junges Forschungsfeld. Während die Existenz adulter Stammzellen in anderen Organen schon seit vielen Jahrzehnten bekannt ist, fanden sich erst in den sechziger Jahren durch Joseph Altman Hinweise auf eine Neurogenese im zentralen Nervensystem ausgewachsener Ratten (Altman 1962). Er war es auch, der 1963 erstmals die Bildung neuer Nervenzellen im Hippocampus von Ratten beobachtete und kurze Zeit darauf die Einwanderung adulter Körnerzellen in den *Bulbus olfactorius* beschrieb (Altman 1969). Ein breites Interesse an der Neurogenese wurde jedoch erst in den 1980ern geweckt. Mithilfe neuer Forschungsmethoden gelang der Nachweis in einer zunehmenden Anzahl verschiedener Spezies, Ende der 1990er schließlich beim Menschen (Eriksson et al. 1998).

Während proliferierende Vorläuferzellen an verschiedenen Orten im Gehirn adulter Säuger zu finden sind, differenzieren diese nur in drei Hirnregionen zu Neuronen aus: im olfaktorischen Neuroepithel der *Regio olfactoria*, in der Subgranulärzone des hippocampalen *Gyrus dentatus* und in der Subventrikulärzone der Seitenventrikel (Brann und Firestein 2014). Aufgrund der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus in den folgenden Kapiteln auf der adulten hippocampalen Neurogenese.

1.1.2. Lage und Neuroanatomie des Hippocampus

Der Hippocampus befindet sich innerhalb der Temporallappenregion beider Hemisphären und wird durch zwei Zellbänder gebildet: den *Gyrus dentatus* und das *Cornu ammonis* (CA). Im Gegensatz zum sechsschichtigen Isokortex besitzen beide Strukturen einen dreischichtigen Aufbau aus Pyramidalzellschicht, Molekularzellschicht und dem *Stratum oriens*, in welchem die Korbzellen zu finden sind (Rajakumar 2013).

Die Mehrheit seiner sensorischen Afferenzen erhält der Hippocampus aus dem entorhinalen Kortex (EC). Über die temporoammonische Bahn und den von Neuronen des entorhinalen Kortex ausgehenden Tractus perforans projiziert der EC auf die CA1-Region und die Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (Amaral und Witter 1989, Witter 2007, Li et al. 2009). Einzelne Neuronen des entorhinalen Kortex innervieren dabei große Areale des DG, zudem sind zahlreiche Regionen des EC mit kleineren Arealen des *Gyrus dentatus* verschaltet (Tamamaki und Nojyo 1993, van Groen et al. 2003). Neben diesen Innervationen befinden sich zahlreiche Interneurone im DG, welche über verschiedene Modi der Inhibition (*feedforward*-, *feedback*- und tonisch) die Aktivierung der Körnerzellen kontrollieren (Acsady und Kali 2007). Studien von Myers und Scharfman zufolge wird dies durch hiläre Mooszellen reguliert, welche dank disynaptischer Verbindungen eine rekurrente Verschaltung der Körnerzellen innerhalb des *Gyrus dentatus* ermöglichen und mit der CA3-Region einen *feedback-loop* formen (Scharfman 2007, Myers und Scharfman 2009). Die Pyramidenzellen der CA3-Regionen bilden durch zahlreiche rekurrente Verbindungen untereinander zudem ein eigenes autoassoziatives Netzwerk (Ishizuka et al. 1990, Neunuebel und Knierim 2014). Über das Moosfasersystem erfolgt eine

Verbindung des DG zu den Hauptneuronen der CA3-Region. Von dort kommt es zu einer Reizweiterleitung zu den Nervenzellen der CA1-Region, welche wiederum mit dem entorhinalen Kortex (EC) verschaltet ist (Tauck und Nadler 1985, van Strien et al. 2009, Szirmai et al. 2012). Über die Commissura hippocampi stehen beide Hippocampi in enger Verbindung.

1.1.3. Funktion des Hippocampus

Der Hippocampus fungiert als wichtige Zwischenstation im Rahmen der Konsolidierung von Erinnerungen, d.h. der Überführung von Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis (Kitamura et al. 2009). Aufgenommene Informationen werden anfangs innerhalb hippocampaler Schaltkreise stabilisiert (short-term-consolidation), um nachfolgend durch wiederholte Reaktivierung dieser neuronalen Netzwerke in kortikale Langzeitspeicher überführt zu werden (Frankland und Bontempi 2005). Klinische und *in vivo* Studien belegen, dass eine bilaterale Schädigung des Hippocampus zu einer anterograden Amnesie führt, wobei frühere Erinnerungen meist erhalten bleiben (Tulving und Markowitsch 1998, Broadbent et al. 2006). Die zeitliche Phase, in welcher eine neue Information vom Hippocampus abhängig ist, wird dabei durch eine Reihe von Faktoren (Spezies, Alter, Rate der Neurogenese etc.) beeinflusst.

Der Hippocampus ist zudem in viele kritische Prozesse des deklarativen Gedächtnisses involviert und essentiell für die Formierung eines episodischen Erinnerungsvermögens (Tulving und Markowitsch 1998, Manns und Eichenbaum 2006, Opitz 2014). Computermodelle sowie Aktivitätsmessungen des Hippocampus *in vivo* weisen auf ein komplexes Zusammenspiel spezifischer neuronaler Mechanismen (*pattern separation, pattern integration, pattern completion*; siehe auch 1.1.5.) innerhalb der verschiedenen Subregionen hin. Sie schaffen die Möglichkeit, Gedächtnisinhalte kontextuell zu ordnen und Erinnerungen miteinander zu verbinden (Neunuebel und Knierim 2014). Die Bandbreite dieser Funktionen verdeutlicht sich darin, dass Nervenzellen des Hippocampus durch eine Vielzahl sensorischer Inputs aktivieren werden können (Cohen und Eichenbaum 1993). Unklar ist dabei, ob der Hippocampus nur der Verarbeitung der Informationen dient oder Erinnerungen auch selbst abspeichern kann.

Weiterhin ist bekannt, dass dem Hippocampus eine zentrale Rolle in der räumlichen Orientierung zukommt. Neben sogenannten *place cells* der CA1-Region, deren Aktivierung sich auf eine bestimmte Position eines Tiers im Raum zurückführen lässt (O'Keefe und Conway 1978, Okada et al. 2017), sind andere Teile des Hippocampus auch in die Abschätzung von räumlichen Abständen, der Verarbeitung der Bewegungsrichtung sowie der Erkennung von Veränderungen der unmittelbaren Umgebung involviert (Hunsaker et al. 2007, Smith et al. 2014, Ito 2018).

Da der *Gyrus dentatus* an vielen hippocampalen Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt ist (McNaughton et al. 1989, Gilbert und Kesner 2003, Morris 2006), wird diskutiert, dass neugeborene Nervenzellen eine essentielle Rolle in der Vermittlung neuronaler Plastizität einnehmen und in viele der o.g. Prozesse involviert sind (siehe auch 1.1.5).

1.1.4. Adulte Neurogenese im *Gyrus dentatus*

Im erwachsenen Gehirn dient die Neurogenese der Bildung neuer Körnerzellen, den Hauptneuronen des DG. Der Reifungsprozess dauert in der Regel ca. 6-8 Wochen und zeigt sowohl bezüglich der Reihenfolge exprimierter Transkriptionsfaktoren als auch der Kaskade der Anbindung an umgebende Neuronen Ähnlichkeiten zur embryonalen Entwicklung des Hippocampus (Esposito et al. 2005).

Im adulten *Gyrus dentatus* koexistieren eine Vielzahl verschiedener Vorläuferzellen (Hodge et al. 2008). Radiäre Gliazellen (RGZ), auch Typ-1-Zellen genannt, sitzen in der Subgranulärzone. Ihre apikalen Fortsätze, die sich bis in die Molekularzellschicht ausdehnen, dienen während der Hirnentwicklung als Führungsschiene für die Einwanderung neuronaler Vorläuferzellen (Xu et al. 2015). Laut der aktuellen Studienlage gelten RGZ als die primären Stammzellen des adulten *Gyrus dentatus* (Bond et al. 2015, Kempermann et al. 2015). Aus Typ-1-Zellen entstehen durch zumeist asymmetrische Teilung sowohl intermediäre Vorläuferzellen (IPCs bzw. Typ-2 Zellen) als auch eine neue RGZ (Suh et al. 2007, Bonaguidi et al. 2012).

Im Gegensatz zu Typ-1 Zellen zeigen die intermediären Vorläuferzellen eine hohe Proliferationsaktivität. Es existieren zwei Subtypen: Die geringer differenzierten Typ-2a Zellen, welche wie die RGZ Merkmale von Gliazellen aufweisen, und die neuronal

determinierten Typ-2b Zellen, die erstmals nervale Marker wie Prox-1 und Doublecortin (DCX) exprimieren (Kempermann et al. 2004, Kempermann 2015). Aus Typ-2b Zellen gehen Neuroblasten (Typ-3 Zellen) hervor (Hodge et al. 2008), deren Fortsätze sich bis in den Hilus erstrecken (Ehninger und Kempermann 2008).

Aus Neuroblasten entstehen schließlich unreife, postmitotische Körnerzellen, welche über Axone bestehender Neurone vom Hilus in die Granularzellschicht einwandern. Etwa eine Woche nach Austritt aus dem Zellzyklus zeigen die jungen Neurone erste Erregungsprozesse (Esposito et al. 2005, Renzel et al. 2013). Aufgrund der anfangs fehlenden Dornenfortsätze sind sie zu diesem Zeitpunkt aber noch nicht in der Lage, empfangene Signale weiterzuleiten (Esposito et al. 2005, Laplagne et al. 2007). Der inhibitorische Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (*gamma-aminobutyric acid*, GABA), der aufgrund differenter Rezeptorendichte unreife Neurone de- statt hyperpolarisiert, spielt eine wichtige Rolle in der Reifung der Körnerzellen (Piatti et al. 2011, Pallotto und Deprez 2014). Ungefähr in der zweiten Woche nach erfolgter Einwanderung in die Granularzellschicht bilden sich erste Dendritenausläufer. Die Zellen ähneln nun morphologisch bereits reifen Körnerzellen und zeigen eine kräftige Expression von NeuN und Calretinin (Kempermann et al. 2004). Die weiter wachsenden Fortsätze stehen in Kontakt mit den Pyramidenzellen der CA3-Region. Axone der neuen Körnerzellen konkurrieren dabei mit bereits existierenden Synapsen des Moosfasersystems (Toni et al. 2008). Man beobachtet zudem erste glutamaterge Signale aus dem EC (Zhao et al. 2006). Mit zunehmender Ausreifung der glutamatergen Verbindungen zeigt sich zwischen zweiter und vierter Woche ein Wechsel zu einer inhibitorischen Wirkung von GABA (Tozuka et al. 2005, Ge et al. 2006).

Die überwiegende Mehrheit neugeborener Zellen wird innerhalb der ersten Wochen vor allem durch apoptotische Prozesse eliminiert. Dabei existieren zwei kritische Zeitfenster. Die erste und anteilig größte Elimination findet bereits in den ersten vier Tagen, im Übergang der intermediären Vorläuferzellen zu den Neuroblasten, statt (Sierra et al. 2010). Einfluss nimmt dabei u.a. der *brain derived neurotropic factor* (BDNF) (Kempermann 2015). Ein weiteres signifikantes Absinken der Zellzahl beobachtet man im Alter von zwei bis drei Wochen. Glutamat wirkt zu diesem Zeitpunkt über N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptoren wesentlich mit an der Formierung der ersten synaptischen Verbindungen und ist kritisch für das Überleben

der jungen Neurone (Esposito et al. 2005, Tashiro et al. 2006, Ge et al. 2007). Insgesamt überlebt etwa ein Drittel der neugebildeten Zellen. (Dayer et al. 2003). Die umgebende Mikroglia ist dabei hauptverantwortlich für den Abbau der aussortierten Zellen (Kempermann et al. 2003, Sierra et al. 2010).

Nach etwa vier bis sechs Wochen sind die Neurone ausgereift und ihre Zellkörper morphologisch nicht mehr von denen älterer Körnerzellen zu unterscheiden. Die endgültige Reifung der Dornenfortsätze erstreckt sich über einen Zeitraum bis zu 8 Wochen, wobei Veränderungen des Dendritenbaums auch noch im Alter von mehreren Monaten beobachtet werden können (Lemaire et al. 2012).

1.1.5. Funktion der adulten Neurogenese im Hippocampus

Auch wenn die Daten sich zum Teil widersprechen, scheinen neugeborene Nervenzellen in eine Vielzahl von hippocampalen Lern- und Gedächtnisprozessen involviert zu sein (Nilsson et al. 1999, Shors et al. 2002, Dupret et al. 2008, Kitamura et al. 2009, Marlatt et al. 2012). So werden sie im Rahmen des räumlichen Referenzgedächtnisses für die Aufnahme und Wiedergabe von Informationen benötigt und sind insbesondere dann wichtig, wenn eine flexible Nutzung der Erinnerungen notwendig ist. Ein Fehlen der Neurogenese schränkt dabei vor allem die allozentrische, nicht aber die egozentrische Orientierung im Raum ein (z.B. Auffinden eines konstanten Objektes bei Veränderung der Startposition) (Eichenbaum 2001, Dupret et al. 2008, Garthe et al. 2014). Viele Studien suggerieren zudem, dass neugeborene Nervenzellen eine wichtige Rolle in der Assoziation verschiedener Gedächtnisinhalte spielen und somit u.a. Grundlage für die Formierung eines Angstgedächtnisses sind (Shors et al. 2001, Saxe et al. 2006, Deng et al. 2009).

Darüber hinaus wird angenommen, dass neue Nervenzellen in das Vergessen bereits gelernter Informationen involviert sind und eine Rolle in der Rekonsolidierung von Erinnerungen spielen (Akers et al. 2014). Axone neuer Körnerzellen konkurrieren im Moosfasersystem mit bereits existierenden Fortsätzen reifer Neurone (Toni et al. 2008). Der stetige Zustrom neuer Körnerzellen führt so möglicherweise zu einer zunehmenden Degradierung früherer Gedächtnisinhalte und bietet gleichzeitig eine Grundlage für die Schaffung neuer Erinnerungen. Weiterhin ist Neurogenese,

insbesondere im ventralen Anteil des Hippocampus, wichtig für die Regulierung von Emotionen, vor allem unter dem Einfluss von Angst und Stress (Snyder et al. 2011a, Castren und Hen 2013).

Das genaue Zellalter, in dem neugeborene Nervenzellen für die Funktion des Hippocampus eine Rolle spielen, wird kontrovers diskutiert. Bereits nach einer Woche formieren die jungen Körnerzellen primitive Verbindungen mit der Molekularzellschicht und der CA3-Region. Erste glutamaterge Erregungen lassen sich nach etwa 14 Tagen messen (Esposito et al. 2005, Ge et al. 2006, Sun et al. 2013, Chancey et al. 2014). Einzelne Studien beobachten bereits in diesem Alter eine Aktivierung einzelner Zellen im Rahmen hippocampaler Lern- und Gedächtnisprozesse (Gould et al. 1999, Trouche et al. 2009b). Die meisten Studien deuten jedoch darauf hin, dass ein effektiver Beitrag erst ab einem Zellalter von vier bis sechs Wochen gewährleistet ist (Kee et al. 2007). Zu diesem Zeitpunkt sind die neugeborenen Körnerzellen aufgrund ihrer erhöhten Erregbarkeit, reduzierter hemmender Einflüsse, einer geringeren Schwelle und größeren Amplitude der Langzeit-Potenzierung plastischer als umgebende ausgereifte Nervenzellen (Kee et al. 2007, Garthe et al. 2009). Dadurch können sie bevorzugt zur Aufnahme und Kodierung neuer Informationen verwendet werden (Ge et al. 2007, Aimone und Gage 2011, Neunuebel und Knierim 2012). In der Tat rekrutieren schon schwache afferente Impulse eine große Anzahl junger Neurone, während gleichzeitig nur wenige reife Nervenzellen aktiviert werden.

Eine in diesem Zusammenhang mit dem *Gyrus dentatus* in Verbindung gebrachte Funktion ist die *pattern separation* (Aimone et al. 2011). *Pattern separation* bedeutet, dass ähnliche, sich nur in Details (z.B. räumlich, zeitlich) unterscheidende Events individuelle neuronale Abdrücke erhalten, sodass sie später trotz sich überschneidender Informationen (Interferenz) separat abgerufen werden können (Yassa und Stark 2011). Tierexperimente und Computermodelle deuten darauf hin, dass insbesondere die jungen Körnerzellen zur *pattern separation* beitragen, indem sie neue Informationen im Verbund mit reifen Nervenzellen in Form kleiner Neuronengruppen effizient kodieren und an die CA3-Region senden können (sogenanntes *sparse coding*) (Clelland et al. 2009, McAvoy et al. 2015). Unterstützt werden sie dabei von den hilären Mooszellen (*mossy cells*), welche durch Aktivierung inhibierender Interneuronen die Aktivität und Erregbarkeit reifer Nervenzellen

regulieren können und somit eine *sparse activation* spezifischer Neuronengruppen ermöglichen (Myers und Scharfman 2009, Jinde et al. 2012, Neunuebel und Knierim 2012, GoodSmith et al. 2017). Da bereits junge Körnerzellen Verbindungen zu den Interneuronen und hilären Mooszellen aufweisen und eine Verringerung der Neurogenese zu gesteigerter Netzwerkaktivität im *Gyrus dentatus* führt, deutet dies darauf hin, dass den unreifen Neuronen eine wichtige regulierende Rolle innerhalb der hippocampalen Schaltkreise zukommt (Toni et al. 2008, Lacefield et al. 2012).

1.1.6. Regulation adulter hippocampaler Neurogenese

Sowohl die Proliferationsrate der neuronalen Vorläuferzellen, ihre Differenzierung, als auch das Überleben von neugeborenen Nervenzellen werden durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst.

Einen besonderen Stellenwert in der Modulierung der adulten hippocampalen Neurogenese kommt der Subgranulärzone zu. In ihr befinden sich neben den neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen verschiedene Gliazellen, Interneurone sowie Endothelzellen. Gemeinsam mit der extrazellulären Matrix stellen diese Zellen eine ideale Umgebung für die Neurogenese, weshalb man sie oft auch als „neurogene Nische“ bezeichnet. Endothelzellen produzieren beispielsweise die Wachstumsfaktoren BDNF und *vascular endothelial growth factor* (VEGF), welche die symmetrische Teilung der Stammzellen fördern (Palmer et al. 2000, Han et al. 2015). Zudem sind auch Stammzellen zur Produktion von VEGF befähigt und können so neben direkter Stimulation ihrer eigenen Proliferation auch zur Formierung und Aufrechterhaltung des Gefäßsystems beitragen (Kirby et al. 2015). Darüber hinaus sind die neurogenen Stammzellen untereinander mittels *gap junctions* verbunden und stehen, teils über direkten Zellkontakt, teils über ihre verschiedenen Rezeptoren, mit einer Vielzahl von Zellen in Kontakt (Kunze et al. 2009). So können sie aufgrund ihrer Ausläufer, welche bis in die Molekularzellschicht des *Gyrus dentatus* reichen, durch die Netzwerkaktivität und Signalstoffe reifer Nervenzellen beeinflusst werden (Kunze et al. 2009, Berg et al. 2013).

Auch Interneurone, insbesondere im Hilus des Hippocampus gelegene Parvalbumin-exprimierende Korbzellen (*basket cells*) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Neurogenese. Das von ihnen synthetisierte GABA hemmt die Teilungsrate

aktiver Stammzellen, während die Proliferation teilungsinaktiver RGZ erhöht wird (Aimone et al. 2014). Die ebenfalls in der neurogenen Nische anzutreffende Mikroglia moduliert die Neurogenese an verschiedenen Stellen. Ruhende Mikroglia überwacht die Reifung neugeborener Nervenzellen und eliminiert über Phagozytose apoptotische Zellen (Vukovic et al. 2012). Aktivierte Mikrogliazellen hingegen exprimieren eine Reihe von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, mit deren Hilfe sie Neurogenese sowohl induzieren als auch hemmen können (Battista et al. 2006).

Weiterhin wird die adulte Neurogenese über eine Vielzahl von Hormonen reguliert. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass Kortisol Einfluss auf die Neurogenese nimmt und insbesondere hohe Stresslevel zu einer Reduktion der Stammzellproliferation sowie verringertem Überleben von jungen Neuronen führen (Gould et al. 1992, Anacker et al. 2013).

Darüber hinaus fand sich in zahlreichen Studien ein spezifischer Einfluss von körperlicher Aktivität auf die adulte Neurogenese. Laufradtraining bewirkt insbesondere eine Zunahme der Zellproliferation im *Gyrus dentatus* (van Praag et al. 1999b), während allgemeine körperliche Aktivität u.a. in eine erhöhte Dichte von Gefäßen im *Gyrus dentatus*, sowie einen signifikanten Anstieg neurotropher Faktoren wie VEGF und BDNF resultiert (Fabel et al. 2003, Kuzumaki et al. 2011). Zudem führt eine Haltung in reizangereicherter Umgebung (*enriched environment*) zu verringerter Zellselektion von jungen Neuronen und erhöhter neuronaler Differenzierung von Vorläuferzellen (van Praag et al. 1999a). Diese Effekte sind vermutlich zum Teil von der körperlichen Aktivität der einzelnen Tiere im *enriched environment* abhängig (Kobilo et al. 2011). Jedoch gibt es mittlerweile viele Belege, dass auch die zugrunde liegenden Lern- und Gedächtnisprozesse Einfluss auf die adulte Neurogenese nehmen können.

1.1.7. Interaktion zwischen Hippocampus-abhängigen Lernen und Neurogenese

Die ersten Hinweise für einen Einfluss Hippocampus-abhängigen Lernens auf die Selektion unreifer Neurone fanden sich im Rahmen assoziativer Lerntests (Gould et al. 1999). Wie sich zeigte, korrelierte die Anzahl überlebender Neurone sowohl mit der Testfrequenz als auch mit der -performance (Leuner et al. 2006). Ein

Überlebensseffekt wurde jedoch nur bei Zellen beobachtet, die zum Zeitpunkt der Tests jünger als drei Wochen waren (Anderson et al. 2011).

In nachfolgenden Studien mit dem Morris water maze (MWM) fand sich in Mäusen und Ratten ein verstärktes Überleben junger Neurone, die zu Beginn des MWM 6-9 Tage alt waren (Epp et al. 2007, Trouche et al. 2009a), einem Zeitpunkt, in dem die unreifen Zellen gerade beginnen synaptische Verbindungen zu anderen Stationen des Hippocampus aufzunehmen (Zhao et al. 2006). Kontrovers dazu zeigte Dubret et al., dass bei Ratten im MWM insbesondere 7-9 Tage alte Körnerzellen durch Apoptose eliminiert werden (Dupret et al. 2007). Ein Fehlen der Apoptose beeinträchtigte sowohl die Zahl der Vorläuferzellen und überlebenden Neurone als auch das Lernvermögen der Tiere (Dupret et al. 2007). Auch Döbrössy et al. beobachteten, dass bei Ratten eine Vielzahl der Zellen, welche in der frühen Phase des MWM entstehen, in der späten Phase des MWM (im Alter von 3-4 Tagen) wieder eliminiert werden. Interessanterweise korrelierte die Anzahl eliminiierter Zellen mit der individuellen Testperformance: je weniger neugeborene Nervenzellen nachgewiesen wurden, desto besser schnitten die Versuchstiere in den Tests ab. Wie Epp et al. an Ratten zeigen konnten, scheint darüber hinaus ein weiteres Zeitfenster im Alter von 11-15 Tagen zu existieren, in welchem räumliches Lernen das Überleben neugeborener Neurone fördert (Epp et al., 2010).

In vielen Arbeiten ließ sich die Regulierung der Überlebensrate direkt auf Hippocampus-abhängige Lernprozesse und nicht auf andere Faktoren wie Stress oder körperliche Aktivität zurückführen (Ambrogini et al. 2004, Trouche et al. 2009b, Anderson et al. 2011). Umgekehrt ermöglicht die Performance in räumlichen Verhaltenstests (z.B. im Morris-Water-Maze) auch einen Rückschluss auf die Rate der Neurogenese (Drapeau et al. 2003). Zudem stellte man fest, dass ein hoher Schwierigkeitsgrad sowie eine niedrige Lernfrequenz das Überleben unreifer Nervenzellen fördern (Sisti et al. 2007, Epp und Galea 2009, Curlik und Shors 2011).

Viele der aufgeführten Studien wurden an Ratten durchgeführt, während bei Mäusen über die komplexen Interaktionen zwischen adulter Neurogenese und Lernen bisher vergleichsweise wenig bekannt ist. Einzelne Arbeiten zeigen auch hier einen positiven Einfluss von Hippocampus-abhängigen Lernprozessen auf das Überleben von neugeborenen Zellen (Trouche et al. 2009b, Haditsch et al. 2013). Demgegenüber steht eine aktuelle Studie, die bei Mäusen nach Lernen im MWM

keine signifikanten Auswirkungen auf das Zellüberleben bzw. Zellproliferation, Apoptose oder dendritische Morphologie nachweisen konnte (Trinchero et al. 2015). Da eine Ablation der Neurogenese bei Mäusen jedoch nachweislich zu deutlichen Einschränkungen in der räumlichen Orientierung führt (Clelland et al. 2009, Sahay et al. 2011), ist anzunehmen, dass speziesspezifische Unterschiede, beispielsweise in der Stressregulierung und verwendeter Suchstrategien sowie auch die verzögerte Reifung der Nervenzellen und die differente Verschaltung der Hirnregionen, mitverantwortlich sind für die bisher kontroverse Studienlage (Whishaw 1995, Snyder et al. 2009b, Epp et al. 2013a).

1.1.8. Immediate early genes und Zif268

Immediate early genes (IEG) sind eine heterogene Gruppe von Genen, die nach Stimulation (intra- und extrazellulär, z.B. durch Wachstumsfaktoren oder elektrische Erregung) sehr rasch und innerhalb eines relativ kurzen Zeitfensters transkribiert werden. Charakteristisch ist hierbei, dass die vermehrte Transkription unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese funktioniert. Vielmehr werden bereits vorhandene Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung aktiviert und in den Zellen transloziert (Tullai et al. 2007).

Es existiert eine Reihe von IEG, deren vermehrte Expression im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen in spezifischen Hirnregionen beobachtet wird. (Lyford et al. 1995, Tashiro et al. 2007, Minatohara et al. 2015). Zu dieser Gruppe gehört das *immediate early gene* Zif268 (*zinc finger binding protein clone 268*), welches als Transkriptionsfaktor sowie mithilfe seiner DNA-unabhängigen Bindungsstellen auf vielen Ebenen synaptischer Plastizität mitwirkt (z.B. Produktion und Transport von Neurotransmittern, Reifung der Dornfortsätze neugeborener Körnerzellen etc.) (Veyrac et al. 2013, Bahrami und Drablos 2016, Duclot und Kabbaj 2017a).

Zif268 lässt sich nach räumlichen Verhaltenstests in verschiedenen Regionen des Hippocampus nachweisen (Bozon et al. 2002, Soule et al. 2008, Trouche et al. 2009b). Experimente mit *zif268*-Knockout-Mäusen suggerieren, dass Zif268 innerhalb des Hippocampus eine wichtige Rolle in der Schaffung neuer räumlicher Erinnerungen und den Abruf bereits etablierter Gedächtnisinhalte spielt (Guzowski et

20

al. 2001). Im *Gyrus dentatus* verfügen einzelne der unreifen Körnerzellen bereits nach einer Woche über die Fähigkeit, nach Verhaltenstests bzw. körperlicher Aktivität Zif268 zu exprimieren (Gould et al. 1999). Mit fortschreitenden Zellalter steigt dieser Anteil sukzessive an und erreicht nach etwa drei Wochen sein Maximum (Snyder et al. 2009b). Das entspricht einem Alter, in dem neue Körnerzellen aufgrund erhöhter Erregbarkeit und einer Reduzierung hemmender Einflüsse eine hohe synaptische Plastizität besitzen und so vermehrt in bestehende neuronale Netzwerke integriert werden können (siehe 1.1.5). In diesem Zeitfenster scheint Zif268 eine kritische Rolle in der Reifung und Rekrutierung der neugeborenen Nervenzellen einzunehmen. Beispielsweise ist es wichtig für die Reifung der Dornenfortsätze und hat somit einen entscheidenden Einfluss auf das Überleben der jungen Neurone (Veyrac et al. 2013).

Im Regelfall ist die Expression von Zif268 und ähnlicher IEG (z.B. c-Fos und Arc) in Neuronen unstimulierter Tiere extrem gering, steigt aber durch neuronale Aktivität rapide an (Kubik et al. 2007). Viele Studien nutzen IEG daher zur Analyse von nervalen Erregungsprozessen, insbesondere im Zusammenhang mit Lern- und Gedächtnisprozessen (Davis et al. 2003, Shires und Aggleton 2008). Da auch junge Nervenzellen Zif268 exprimieren können (Snyder et al. 2009a), eignet es sich zudem zur Untersuchung einer funktionellen Integration neugebildeter Nervenzellen in bestehende neuronale Netzwerke (Farivar et al. 2004, Duclot und Kabbaj 2017b).

1.2. *Spreading Depression*

Erstmalig beschrieben wurden *cortical spreading depressions* (CSD) im Jahre 1944 von dem brasilianischen Biologen Aristides Leão. Bei dem Versuch, künstliche Epilepsien an anästhesierten Kaninchen auszulösen, beobachtete er nach mechanischer oder elektrischer Stimulation eine sich mit 2-5 mm/min langsam und wellenförmig ausbreitende elektrische Aktivität im Kortex der Tiere. Diese schien funktionelle oder vaskuläre Grenzen zu ignorieren und führte nachfolgend zu einer transienten, zwischen fünf bis zehn Minuten anhaltenden Inhibition spontaner und evozierter elektrischer Erregungen der betroffenen Areale (*depression*) (Leão 1944).

SD lassen sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Hirnschnitte, Zellkulturen) hervorrufen (Schock et al. 2008, Gniel und Martin 2013, Pietrobon und Moskowitz 2014, Viggiano et al. 2014). Während sich eine klare Präferenz für bestimmte Areale des zentralen

Nervensystems zeigt, können SD prinzipiell überall dort ausgelöst werden, wo sich graue Substanz findet. Besonders empfindlich sind neuronenreiche Areale wie Kortex und Hippocampus (Albe-Fessard et al. 1984, Vinogradova et al. 1991, Fujita et al. 2016). CSD können durch mechanische Stimulation, elektrische Reizung oder Applikation depolarisierender Substanzen ausgelöst werden (Amemori und Bures 1990, Taga et al. 1997, Somjen 2001, Mun-Bryce et al. 2006, Martens-Mantai et al. 2014, Sato et al. 2014). Auch eine kontinuierliche Auslösung von CSD mittels einer intrazerebralen Kaliumchlorid-Osmose-Pumpe ist möglich (Yanamoto et al. 2000).

Mittlerweile weiß man, dass SD auch im menschlichen Gehirn bei einer Reihe von pathologischen Zuständen (u.a. Hypoxie, intrakraniellen Blutungen) auftreten können und bei vielen Erkrankungen (z.B. Migräne und Epilepsie) eine zentrale Rolle spielen (Lauritzen et al. 2011b, Chase 2014, Cui et al. 2014). Nach erfolgter CSD beobachtet man zudem eine adaptive Antwort vor allem CSD-naher Hirnsubstanz, welche nachweislich zu einer vorübergehenden Ischämietoleranz der Nervenzellen führt (Taga et al. 1997, Otori et al. 2003). Ähnliche Effekte wurden auch in CSD-fernen Hirnarealen, wie dem Hippocampus nachgewiesen (Kawahara et al. 1997). Als mögliche Ursachen werden u.a. eine vermehrte Aktivierung von Astrogliazellen sowie die Hochregulierung neurotrophischer Faktoren diskutiert (Kawahara et al. 1999, Tamura et al. 2012). Während die genauen neuroprotektiven Mechanismen bislang ungeklärt sind, werden zunehmend auch mögliche therapeutische Anwendung einer sogenannten CSD-Präkonditionierung im klinischen Setting sichtbar (Wiendl et al. 2015, Kramer et al. 2016).

1.2.1. Entstehungs- und Ausbreitungsmechanismen einer SD

Die Studienlage zu Entstehung und Ausbreitung einer SD ist nicht eindeutig und teils widersprüchlich. Die Grundannahme ist, dass freigesetztes Glutamat postsynaptische NMDA-Rezeptoren aktiviert und durch Depolarisierung der Neuronen zu weiterem Glutamat-Ausstoß führt (Harreveld und Fifková 1970, Marrannes et al. 1988, Lauritzen und Hansen 1992). In der Tat kommt es während einer SD zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentration, jedoch scheint dies nicht direkt mit Auslösung und Ausbreitung einer SD zu korrelieren (Zhou et al. 2013). So lassen sich erhöhte Glutamat-Konzentrationen zwar im

Ausgangsbereich einer SD nachweisen, jedoch nicht immer im nachgeschalteten Gewebe, in dem sich die Welle ausbreitet (Scheller 1993). Zudem sind Aktionspotentiale und evozierte synaptische Potentiale wohl nicht für eine SD verantwortlich, da im Rahmen einer SD die Großzahl spannungsabhängiger Natrium-Kanäle deaktiviert wird (Czeh et al. 1993).

Untersuchungen mit künstlicher zerebrospinaler Flüssigkeit favorisieren hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen ($[K^+]_e$) und nicht Glutamat als Initiator einer SD (Obrenovitch und Zilkha 1995). Ein kombiniertes Wirken beider Substanzen ist wahrscheinlich. Einen Hinweis darauf geben die Glia-Zellen. Ihre Fähigkeit, Glutamat und Kalium aufzunehmen, schützt Gewebe vorm Ausbreiten einer Depolarisationswelle (Gardner-Medwin 1981), ein Sistieren ihrer Funktion begünstigt wiederum das Entstehen einer SD (Largo et al. 1997). Weiterhin lösen hohe $[K^+]_e$ die Mg^{2+} -abhängige Blockade postsynaptischer NMDA-Rezeptoren und ermöglichen so ein Wirken schon geringer Mengen von Glutamat (Obrenovitch et al. 1996).

1.2.2. Elektrophysiologie einer SD

Eine *spreading depression* folgt in aller Regel einem festen Muster im Elektrokortikogramm (EcoG) und Elektroenzephalogramm (EEG). Wenige Sekunden nach der initialen Stimulation beobachtet man im EcoG nach einer sporadisch auftretenden schwachen Positivierung des Gleichspannungspotentials (DC) eine deutliche, sich innerhalb von 30-60 sec entwickelnde Negativierung (*DC shift, slow negative wave*) um bis zu 20 mV (Leão 1944). Meistens zeigt sich zu Beginn des Prozesses eine kurze, 2-3 sec anhaltende neuronale Aktivität (*burst of activity*) (Grafstein 1956). Nach etwa 1-2 min kommt es zu einer wiederholten Umkehrung des DC, welche 3-5 min anhält. Im Zuge dessen beobachtet man im EEG ein bis zu 10 min dauerndes Sistieren sämtlicher spontaner elektrischer Aktivität. Dies ist bedingt durch die vollständige Depolarisation der Nervenzellen und ein Anstieg des Membranpotentials von -70 mV auf -10 mV, was Aktionspotentiale und physiologische Neurotransmission verhindert (Bureš 1974).

Grundlage dieser Prozesse sind massive Veränderungen intra- und extrazellulärer Ionenkonzentrationen von Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Kalzium (Ca^{2+}) und Chlorid (Kraig und Nicholson 1978, Peters et al. 2003, Zhou et al. 2013). Aufgrund der

23

nachfolgenden Hyperosmolarität der Neuronen kommt es zum Anschwellen der Nervenzellkörper und Dornenfortsätze. Die dadurch bedingte Reduktion des extrazellulären Raumes um etwa 50% beeinflusst wiederum die extrazellulären Ionenkonzentrationen (Mazel et al. 2002).

Unter physiologischen Bedingungen sind die Veränderungen größtenteils selbstlimitierend. Eine Reihe von Mechanismen der Nervenzellen und Astroglia (u.a. intrazelluläres Ca^{2+} -Buffering, K^+ -Wiederaufnahme durch die Na^+ - K^+ -ATPase) sowie umgebender Gefäße sorgen in der Regel innerhalb einer Minute für die Wiederherstellung der Ionen- und Flüssigkeitshomöostase (Fields und Stevens-Graham 2002, Lian und Stringer 2004, Ayata und Lauritzen 2015).

1.2.3. Metabolismus, Hämodynamik und Genexpression

Im Rahmen der beschriebenen elektrophysiologischen Vorgänge kommt es zu zahlreichen metabolischen Veränderungen, welche im betroffenen Gewebe u.a. zu vorübergehend erhöhten Umsatz von ATP, gesteigerten Glukosemetabolismus und Absinken des pH-Wertes führen (Gjedde et al. 1981, Mies und Paschen 1984, Kocher 1990). Weiterhin beobachtet man während einer CSD auch Veränderungen der Hirnperfusion (Lauritzen 1984), da die Depolarisationswelle u.a. zu einer Umkehr der neurovaskulären Kopplung führt. Zu Beginn einer CSD kommt es zu einer temporären Verringerung des zerebralen Blutflusses (CBF) (Dreier et al. 2009). Zeitgleich mit dem Wechsel des Gleichspannungspotentials zeigt sich eine etwa 2 min dauernde Vasodilatation kortikaler Arteriolen mit konsekutiver Hyperperfusion (Lauritzen 1987, Fabricius et al. 1995, Piilgaard und Lauritzen 2009), gefolgt von einer reaktiven Engstellung der Hirngefäße nach Wiederherstellung der Ionenhomöostase (Lauritzen et al. 2011a).

Darüber hinaus finden sich nach CSD massive Veränderungen der Proteinsynthese und Genexpression im ipsilateralen Kortex (Somjen 2001, Urbach et al. 2006, Lauritzen et al. 2011a, Rana et al. 2012). Bekanntermaßen werden im CSD-nahen Hirngewebe u.a. verschiedene mit Neurogenese in Verbindung gebrachte IEG wie c-Fos, Zif268, Erg2 und Erg4 hochreguliert (Lee und Bondy 1993, Urbach et al. 2006). Zudem beobachtet man in der Nähe der Depolarisationswelle eine vermehrte Expression neurotropischer Faktoren wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und

BDNF, sowie eine verstärkte Aktivierung von PC3, dem eine Rolle in der neuronalen Differenzierung von Vorläuferzellen zugeschrieben wird (Matsushima et al. 1998, Kawahara et al. 1999, Canzoniere et al. 2004, Hayashida et al. 2010).

1.2.4. CSD und hippocampale Neurogenese

Wie aus vorherigen Studien bekannt, findet sich bei Nagetieren nach CSD eine deutliche Steigerung der ipsilateralen hippocampalen Neurogenese (Urbach et al. 2008, Urbach et al. 2017). CSD bewirken eine massive Proliferation neurogener Vorläuferzellen, ohne dass ein vermehrter Zelluntergang beobachtet werden kann. Die neugeborenen Zellen differenzieren neuronal aus und lassen sich für mindestens 6 Wochen im Hippocampus nachweisen. Auch im kontralateralen *Gyrus dentatus* zeigt sich eine gering erhöhte Neurogenese, wobei hier die zugrunde liegenden Mechanismen noch weitestgehend ungeklärt sind.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass CSD den Hippocampus nicht direkt erreichen (Wernsmann et al. 2006, Urbach et al. 2008). Diskutiert wird eine indirekte Aktivierung des ipsilateralen Hippocampus durch Erregung des entorhinalen Kortex (Chun et al. 2006, Stone et al. 2011a). Nach CSD beobachtet man im Hippocampus mit einer Latenz von wenigen Tagen einen Anstieg der neuronalen BDNF-Level (Kawahara et al. 1997). BDNF nimmt Einfluss auf Proliferation sowie Differenzierung neuronaler Stammzellen (Pencea et al. 2001, Chen et al. 2014, Yang et al. 2015). Es ist anzunehmen, dass auch neuronal freigesetztes Glutamat in die Vermittlung der vermehrten Zellproliferation und neuronalen Differenzierung im *Gyrus dentatus* involviert ist (Kawahara et al. 1997, Urbach et al. 2006).

2. Ziele der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Urbach et al. 2008) zeigte sich bei Ratten nach CSD eine deutliche Steigerung der adulten hippocampalen Neurogenese. Trotzdem konnten 6 Wochen nach CSD keine signifikanten Veränderungen des räumlichen Referenzgedächtnisses detektiert werden. Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Versuchsreihe, welche die Methode auf das Mausmodell übertrug. Auch hier fand sich nach CSD eine massiv erhöhte Neurogenese im *Gyrus dentatus*. Da die aktuellere Studienlage suggerierte, dass neugeborene Nervenzellen innerhalb eines kritischen Zeitfenster (etwa 4 Wochen nach ihrer Geburt) dank erhöhter Plastizität zur hippocampalen Funktion beitragen, wurden mittels verschiedener Verhaltenstests die Langzeiteffekte von CSD auf hippocampale Plastizität sowie kognitive und psychomotorische Prozesse überprüft (Urbach et al. 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mithilfe des *immediate early gene* Zif268 (siehe auch 1.1.8) untersucht werden, in welchem Ausmaß die nach CSD vermehrt nachweisbaren neugeborenen Nervenzellen rekrutiert und funktionell in bestehende neuronale Schaltkreise des *Gyrus dentatus* integriert wurden. Weiterhin interessierte uns, welche Interaktionen zwischen der Anzahl integrierter Zellen und Hippocampus-abhängigen Lernen bestehen. Zudem sollte anhand der Färbung von NeuN analysiert werden, ob CSD oder Verhaltenstests einen Einfluss auf die neuronale Differenzierung neugeborener Zellen im Mausmodell besitzen.

3. Material und Methoden

Diese Arbeit baut auf einer Versuchsreihe auf, die von Eileen Baum im Rahmen ihrer Dissertation entworfen und verwirklicht wurde (Baum 2016). Eileen Baum führte die in folgenden Abschnitten beschriebenen Tierversuche und Operationen sowie die immunhistologische Quantifizierung neugeborener Zellen durch. Der Autor der vorliegenden Arbeit war für die Immunfluoreszenzfärbung und deren Auswertung verantwortlich.

3.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden 167 männliche C57BL/6J Mäuse aus der Zucht des IVTK (Universitätsklinikum Jena) verwendet. Zum Zeitpunkt der Versuche waren die Tiere zwischen 10 und 12 Wochen alt. Untergebracht wurden sie in Standardkäfigen vom Typ II short (2 bis 3 Tiere, 26,5 cm x 20,7 cm x 14 cm) und Typ II long (bis 5 Tiere, 36,5 cm x 20,7 cm x 14 cm). Die Beleuchtung wurde auf einen 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus eingestellt, welcher 7:30 Uhr begann. Die Tiere hatten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Futter. Alle Tierversuche fanden während des Tages statt. Um Rangordnungskämpfe zu vermeiden und deren Einfluss auf die Versuchsreihe einzudämmen, wurden Käfigwechsel auf ein Minimum beschränkt.

Alle Tierexperimente wurden entsprechend der gültigen Vorschriften der Europäischen Richtlinie 86/609/EEC für Tierexperimente durchgeführt und durch das Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Dezernat Tierschutz, geprüft (Antragsnummer 02-012/07). Alle Experimente wurden gemäß den ARRIVE Richtlinien dokumentiert.

3.2. Projektdesign

Die Versuche waren in drei Projekte untergliedert, wobei im Folgenden nur die zwei Projekte beschrieben werden, die Grundlage der vorliegenden Arbeit sind.

Das erste Projekt nutzte das *Morris water maze* (MWM), eine Versuchsanordnung, welche die Untersuchung des Hippocampus-abhängigen räumlichen Referenzgedächtnisses ermöglicht. Im Vorfeld zum MWM durchliefen die Mäuse den Open-Field-Test (OF), den location novelty recognition-Test (LNR) sowie den object

novelty recognition-Test (ONR) (siehe 1.3 und 3.5). Um einen Einfluss von testbedingtem Stress auf die Versuchsreihe zu minimieren, wurden die Verhaltenstests gemäß des zunehmenden Stressniveaus angeordnet (siehe Abb. 3.1A). Im zweiten Projekt durchliefen Versuchstiere keinen der Verhaltenstests, wurden darüber hinaus aber analog zu den Tieren in Projekt 1 behandelt. So konnte ein möglicher Einfluss der Verhaltenstests auf die hippocampale Neurogenese nach CSD evaluiert werden.

Beide Projekte wurden entsprechend des Abstands zwischen operativem Eingriff und Eintritt in das MWM in drei Gruppen unterteilt (G1: Beginn des MWM 14 Tage nach sham/SD, G2: 28 Tage, G3: 42 Tage; siehe Abb. 3.1). Die Zeitpunkte wurden gewählt, um verschiedene Reifestadien neugeborener Körnerzellen und deren Einfluss innerhalb der Testreihe zu untersuchen (siehe 1.1.6). Um zu analysieren, ob die operativen Eingriffe Einfluss auf die Versuchsreihe nehmen, wurde innerhalb der Gruppe 2 (28 Tage) beider Projekte jeweils eine native Kontrollgruppe geschaffen, welche die Experimente unbehandelt durchliefen. Die Versuchstiere wurden den Gruppen zufällig zugeteilt (8 Tiere pro sham-Gruppe, 7-10 Tiere pro CSD Gruppe, 5-7 Tiere pro nativer Gruppe; siehe Tab. 3.1) und randomisiert untersucht. Die Operationen und Tierversuche wurden verblindet durchgeführt

Projekt	Gruppe	Tierzahl		
		SD	sham	nativ
1	<i>Tiere mit Verhaltenstests</i> (n = 62)	1	10	8
		2	10	8
		3	10	7
2	<i>Tiere ohne Verhaltenstests</i> (n = 43)	1	7	8
		2	8	8
		3	7	5

Tab. 3.1: Tabellarische Darstellung der Tierzahlen n und deren Verteilung auf die verschiedenen Gruppen. Modifiziert nach Baum, 2016.

Am Tag 0 fanden die Operationen zur Induktion der CSDs bzw. die sham-Operationen statt (siehe 3.3). Zur Markierung proliferativer Zellen wurde den Tieren in den darauffolgenden 6 Tagen alle 24h der Proliferationsmarker 5'-Iod-2'-desoxyuridin (IdU) intraperitoneal verabreicht (siehe 3.4). Um einen möglichen

Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf diesen Arbeitsschritt gering zu halten, fanden die Injektionen zur gleichen Uhrzeit wie die initiale Injektion (+/- 1h) statt. Zusätzlich erhielten die Mäuse eine Stunde nach Abschluss der Akquisitionsphase des MWM sowie sechs weitere Male im Abstand von jeweils 24 Stunden eine intraperitoneale Injektion des Proliferationsmarkers 5'-Chlor-2'-desoxyuridin (CldU). CldU wurde ursprünglich eingesetzt, um den Einfluss der Hippocampus-abhängigen Verhaltenstests auf die Neurogenese zu untersuchen. CldU konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgewertet werden, da die Etablierung eines Färbeprotokolls misslang.

Die Tiere wurden 90 min nach den MWM *probe trials* (Gedächtnisabruf) mittels transkardialer Perfusion getötet. Diese Zeitspanne wurde verwendet, um in neugebildeten Nervenzellen den Nachweis von IEG wie z.B. Zif268 zu ermöglichen und darüber Rückschlüsse auf ihre Rekrutierung und funktionelle Integration in das bestehende Netzwerk zu ziehen (siehe 1.1.8). Aus Vorstudien ist bekannt, dass die Expression von Zif268-Protein etwa 60-90 min nach Abschluss eines Trainings ihr Maximum erreicht (Lonergan et al. 2010).

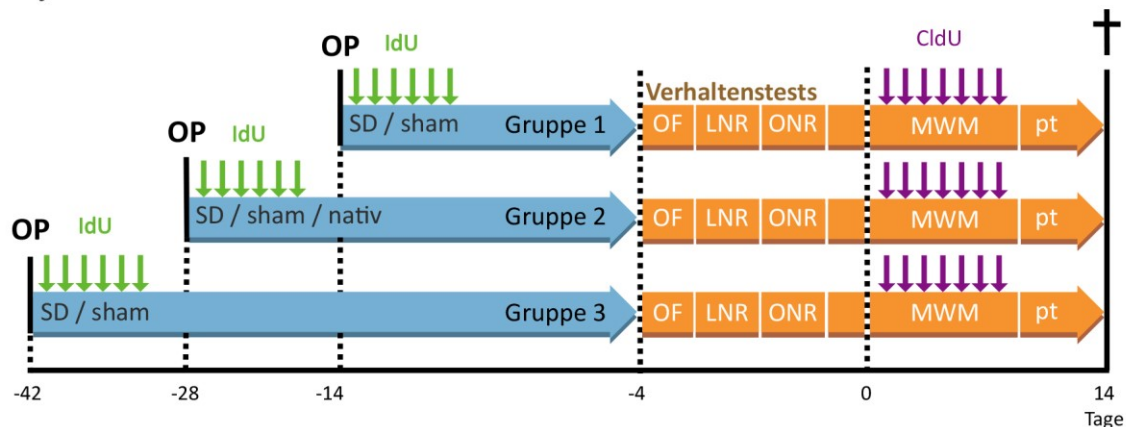
Zur Identifizierung reifer Nervenzellen diente NeuN, ein in der Forschung häufig genutzter Marker neuronaler Maturierung. Im Hippocampus wird NeuN nach etwa 3 Wochen in fast allen neugeborenen Körnerzellen exprimiert (Brandt et al. 2003, Kim et al. 2009, Snyder et al. 2009b). (Zum Nachweis von IdU, NeuN und Zif268 siehe 3.6.2)

Projekt		Gruppe	Alter der IdU ⁺ - Zellen zu Beginn der Vortest	Alter der IdU ⁺ - Zellen zum Beginn des MWM	finales Alter IdU ⁺ - Zellen
1	<i>Tiere mit Verhaltenstests</i>	1	4-9 d	8-13 d	21-26 d
		2	18-23 d	22-27 d	35-40 d
		3	32-37 d	36-41 d	49-54 d
2	<i>Tiere ohne Verhaltenstests</i>	1	4-9 d	8-13 d	21-26 d
		2	18-23 d	22-27 d	35-40 d
		3	32-37 d	36 – 41 d	49-54 d

Tab. 3.2: Tabellarische Darstellung der Zellalter der IdU⁺-Zellen der beiden Projekte zu Beginn der Vortest (OF, ONR, LNR), zu Beginn des MWM sowie das Alter zum Zeitpunkt der Perfusion. Abk.: IdU - 5'-Iod-2'-desoxyuridin; LNR - *location novelty recognition* -Test; MWM - *Morris water maze*; OF – *Open-Field-Test*; ONR - *object novelty recognition-Test*; d – Tage. Modifiziert nach Baum, 2016.

A

Projekt 1 - Tiere mit Verhaltenstests



B

Projekt 2 - Tiere ohne Verhaltenstests

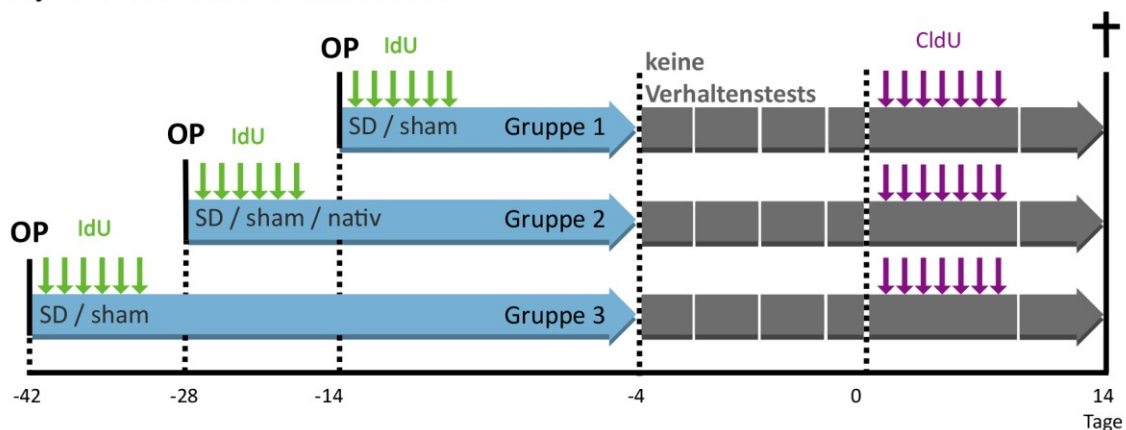


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Projektdesigns und Projektablaufs. A) Projekt 1 – Tiere mit Verhaltenstest. Die drei blauen Pfeile geben die 3 untersuchten Zeitgruppen an. Mit Beginn der orangen Pfeile treten die Tiere in eine Serie von Verhaltenstests ein. OP markiert den Beginn der Experimente durch Induktion von SD oder sham. Die grünen Pfeile geben die Applikationszeitpunkte des Proliferationsmarkers IdU an, die violetten Pfeile die Applikationszeitpunkte des Proliferationsmarkers CldU. B) Projekt 2 - Gruppen ohne Verhaltenstests. Alle Zeitgruppen wurden unter gleichen Bedingungen wie in A) behandelt. Dabei wurden die Spritzintervalle äquivalent zu A) eingehalten. Abk.: CldU - 5'-Chlor-3'-desoxyuridin; ct - control trial; IdU - 5'-Iod-2'-desoxyuridin; LNR - location novelty recognition - Test; MWM - Morris water maze; OF - Open-Field-Test; ONR - object novelty recognition -Test; OP – Induktion von SD oder sham; pt - probe trial. Modifiziert nach Baum, 2016.

3.3. Operative Eingriffe (SD/sham)

Vor Beginn der operativen Eingriffe wurden die Tiere mittels 2.5 % Isofluran (in 2:1 N_2O/O_2 -Gemisch (60l/30l)) narkotisiert. Nach erfolgter Anästhesie wurde der Kopf der Tiere in ein stereotaktisches Gerüst eingespannt. Nach Aufpräparation der Schädelkalotte wurden im Bereich der rechten Hemisphäre zwei Trepanationen von

1,4 mm Durchmesser (1,5 mm lateral, Bregma +1,5 mm; 2 mm lateral, Bregma -2,5 mm) gesetzt, ohne dabei die Dura mater zu perforieren (siehe Abb. 3.2a).

Zur Signalmessung dienten eigens angefertigte Borosilikatglaselektroden (2-4 M Ω), in welchen ein chlorierter Silberdraht installiert wurde. Die Elektroden wurden mit künstlichem Liquor cerebrospinalis (aCSF: 120 NaCl, 2 CaCl₂, 5 KCl, 1.8 MgCl₂, 10 HEPES, 1.25 NaH₂PO₄ und 10 Glukose; in mmol/L; pH 7.4) befüllt. Zur Messung des Gleichstrom-Potentials und des Elektrokortikogramms wurden die Elektroden auf der Dura angebracht. Eine subkutane nuchale Elektrode fungierte dabei als Bezugspotential. Die abgeleiteten Messwerte wurden digital verstärkt (EXT-08, NPI, Tamm, Germany), analog-digital konvertiert (CED 1401, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, England) und mit Hilfe von Spike2 Software (Cambridge Electronic Design Ltd.) gesichert. Nach Anbringen der Elektroden wurde das Isofluran schrittweise auf 1,5% zurückgefahren. Die abgeleiteten Elektrodenpotentiale stabilisierten in dieser Zeit.

Die Induktion der CSD wurde durch Auflegen eines kleinen Tupfers durchgeführt, der in 1,5 mol/L KCl getränkt war und auf der Dura im Bereich der posterioren Trepanationsstelle positioniert wurde (siehe Abb. 3.2). Alle 5 min wurde der Tupfer ausgetauscht. Nach insgesamt 110 min wurde die Trepanationsstelle gründlich mit künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit ausgewaschen und mit Hilfe von Knochenwachs verschlossen. Danach wurde die darüberliegende Wunde unter 2% Isofluran zugenäht. Nur Tiere mit mehr als 4 SD wurden ausgewertet.

Bei Tieren der sham-Gruppe wurden die Tupfer mit äquimolarer NaCl-Lösung (1,5 M) getränkt; alle anderen Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

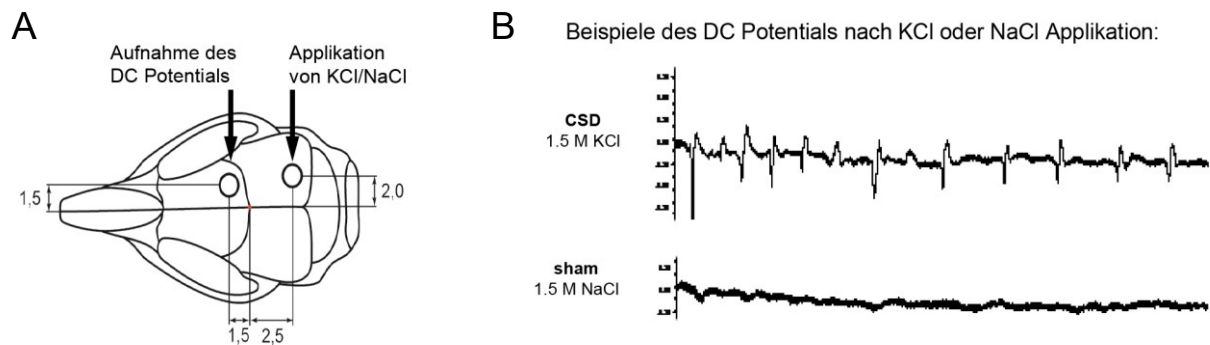


Abb. 3.2 Darstellung des chirurgischen Eingriffs und der Messung. A) Schematische Darstellung der Trepanationspositionen ausgehend von Bregma in mm. An der anterioren Trepanation findet die Messung des ECoG und des DC-Potentials statt, während an der hinteren Position die Applikation der Lösungen erfolgt. B) Messungen der Gleichstrompotentiale während der Induktion von SD oder sham. Modifiziert nach Baum, 2016.

3.4. Markierung neugeborener Zellen

Zur Markierung proliferativer Zellen im *Gyrus dentatus* wurden die halogenierte Nukleotide 5'-Iod- 2'-desoxyuridin (IdU; 57,5 mg/kg in 0,9% NaCl/0,04 N NaOH; MP Biomedicals) und 5'-Chlor-2'-desoxyuridin (CldU; 42,5 mg/kg in 0,9% NaCl; Sigma Aldrich) genutzt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Thymidinanaloga, welche während der Synthesephase statt Thymidin in die DNA sich replizierender Zellen eingebaut werden. Da die Zellen sie bei erneuter Teilung an ihre Tochterzellen weitergeben, werden auch von ihnen abstammende Nachkommen markiert. Im Rahmen dieser Arbeit war das hilfreich, da die neugeborenen Vorläuferzellen bis zum Erreichen des Neuroblastenstadiums (je nach Stadium zum Zeitpunkt der Markierung bis zu 2-3 Wochen) die Fähigkeit zur Teilung behalten (siehe 1.1.4). Alle Substanzen wurden in einer äquimolaren Dosierung (IdU 57,5 mg/kg; CldU 42,5 mg/kg) verwendet. Die Detektion von IdU erfolgte mit Hilfe des antiBrdU Antikörper mouse anti-BrdU (Becton Dickinson, # 347580).

Das individuelle Injektionsvolumen der Thymidinanaloga wurde anhand des Körpergewichts jeder einzelnen Maus ermittelt und unter einer 1-minütigen Isoflurannarkose (3,0 %, N₂O:O₂ 2:1) intraperitoneal verabreicht (zur Abfolge der Injektionen siehe 3.2.).

3.5. Verhaltenstests

Die folgenden Verhaltenstests wurden durch Eileen Baum durchgeführt und ausgewertet. Jede Maus durchlief einzeln und in festgelegter Reihenfolge die verschiedenen Verhaltenstests. Zwei Tage vor Beginn der Trials wurden die Versuchstiere einem *handling* unterzogen, das der Gewöhnung von Tier und Experimentator dient und somit den potentiellen Einfluss dieser Stressquelle eindämmt.

3.5.1. Open-Field-Test

Der Open-Field-Test (OF) ist eine Methode, mit deren Hilfe die allgemeine Aktivität, das Erkundungsverhalten und die emotionale Reaktion von Tieren in neuen und unbekannten Umgebungen sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht werden kann (Gould T.D. 2009). Das *open field* ist ein abgeschlossener Raum mit meist quadratischer, rechteckiger oder runder Form, welchen die Tiere entweder freiwillig betreten können (freiwilliges *open field*) oder in den sie eingesetzt werden (erzwungenes *open field*). Anschließend beobachtet man das Bewegungsmuster und Verhalten der Tiere über Messung verschiedener Parameter, wie etwa der zurückgelegten Wegstrecke, der Geschwindigkeit oder bestimmter Verhaltensweisen bzw. ihrer Abfolge. Da eine ganze Reihe von Faktoren auf die motorische Aktivität und das Verhalten der Tiere Einfluss nehmen können, eignet sich der Open-Field-Test für eine Vielzahl von Fragestellungen.

In dieser Arbeit wurde eine undurchsichtige Acrylbox (40 x 40 x 35 cm) genutzt, welche durch ein Gitternetz in eine 24 x 24 cm messende zentrale Zone und eine 8 cm breite periphere Zone unterteilt wurde. Zu Beginn des Testlaufes wurden die Versuchstiere in eine zufällig ausgewählte Ecke der Box abgesetzt und 10 min lang beobachtet. Dabei wurde die zurückgelegte Wegstrecke, die durchschnittliche Geschwindigkeit, die Aufenthaltszeit in den verschiedenen Zonen, die Abgabe von Fäzes (als Stressindikator), das *rearing* der Tiere (Aufrichten der Maus) und das Putzverhalten aufgezeichnet und ausgewertet. Das *open field* wurde dabei mit 25 Lux ausgeleuchtet.

3.5.2. Location novelty recognition-Test

Der *location novelty recognition*-Test (LNR) (Ennaceur und Delacour 1988) ist ein simpler Explorationstest, der die natürliche Neigung von Nagetieren nutzt, bevorzugt Neues zu erkunden. Er ermöglicht eine Einschätzung der Fähigkeit eines Versuchstieres, räumliche Veränderungen von Objekten wahrzunehmen und eignet sich daher für die Untersuchung Hippocampus-abhängigen Lernens.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Acrylbox mit den oben beschriebenen Dimensionen und Aufteilung verwendet, die jedoch aus durchsichtigem Plexiglas bestand, um den Mäusen eine räumliche Orientierung zu ermöglichen. Zusätzlich wurden oberhalb der Box drei gut sichtbare Marker installiert. Als Versuchsobjekte dienten zwei identische grüne Plastikautos, die in der Box platziert wurden. In einer 3x5 min dauernden Habituerungsphase konnten sich die Mäuse an die Umgebung und die vorher positionierten Versuchsobjekte gewöhnen. Nun wurden beide Objekte durch einen zweiten identischen Satz ausgetauscht, wobei eines der Objekte an einer neuen Position platziert wurde. In der sich anschließenden Testphase (5 min) beobachtete man das Explorationsverhalten der Tiere. Ein Objekt galt als erkundet, wenn das Versuchstier ihm sich auf zwei Zentimeter annäherte und in die Richtung des Objektes blickte. Tiere, deren gesamte Explorationszeit weniger als eine Sekunde betrug, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.5.3. Object-Novelty-Recognition-Test

Der Object-Novelty-Recognition-Test (ONR) ist ein Verhaltenstest, der sich ähnlich dem LNR die Neugier der Versuchstiere zunutze macht und somit einschätzt, wie gut sie Veränderungen von Form, Textur und Farbe eines Objektes bemerken. Im Gegensatz zum LNR bleibt dabei die Position der Versuchsobjekte konstant.

Im ONR wurde die bereits für das OF beschriebene Acrylbox verwendet, jedoch wurden vor Testbeginn die zusätzlich angebrachten externen Raummarkierungen entfernt. In der Explorationsarena wurden zwei identische grüne Plastikautos platziert. Wieder gab es 3x5 min dauernde Habituerungsphasen mit einem Inter-Trial-Intervall von 20 min. Vor der sich anschließenden Testphase (Dauer: 5 min) wurde ein Auto durch ein neues Objekt ersetzt (ein Gumminashorn), das andere Auto durch ein identisches Replikat ausgetauscht. In gleicher Weise wie beim LNR galt ein Objekt als erkundet, wenn das Versuchstier ihm sich auf zwei Zentimeter annäherte

und in die Richtung des Objektes blickte. Tiere, deren Gesamtexplorationszeit weniger als eine Sekunde betrug, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

3.5.4. Morris water maze

Das *Morris water maze* (Morris 1984) ist eine in den Neurowissenschaften oft verwendete Apparatur zur Untersuchung räumlicher Orientierung und damit assoziierter Gedächtnisprozesse. Während es ursprünglich für die Erforschung des räumlichen Referenzgedächtnisses gedacht war, erlauben Modifikationen des MWM auch eine Analyse anderer Domänen wie Arbeitsgedächtnis oder Rekonsolidierung (Vorhees und Williams 2006b). Im Grundaufbau besteht das MWM aus einem mit Wasser gefüllten runden Becken, in das eine nicht sichtbare Plattform positioniert wird. Das Versuchstier bekommt nun die Aufgabe, die Plattform zu lokalisieren und sich den Standort dieser einzuprägen. Dabei stehen dem Tier im Versuchsraum meist Landmarken (*extramaze cues*) zur Verfügung. Das MWM eignet sich für die Arbeit mit einer Vielzahl von Spezies. Hauptsächlich wird es mit Nagetieren genutzt, es existieren aber auch virtuelle Versuchsapparaturen für Experimente mit Menschen (Kallai et al. 2005). Ein Vorteil gegenüber anderen Lerntests wie dem Barnes maze ist die relative Immunität der Messdaten gegenüber dem Einfluss von individuellem Körpergewicht oder Aktivität der Versuchstiere (Vorhees und Williams 2006a). Die natürliche Aversion gegenüber Wasser sorgt weiterhin für eine erhöhte Motivation die Plattform zu finden. Außerdem erschwert die Wasseroberfläche eine Orientierung über den Geruchssinn und bietet keine lokalen Landmarken (Block 1999). Als Nachteil gegenüber landbasierten Verhaltenstests wird diskutiert, dass die Flucht aus dem Wasser zu einem erhöhten Stresslevel führt, der sich negativ auf das räumliche Lernen auswirken kann (Holscher 1999).

In dieser Arbeit wurde ein kreisrundes Becken mit einem Durchmesser von 120 cm und einer Höhe von 40 cm als MWM verwendet, welches mit Milch getrübtem Wasser (Temperatur: 24 ± 1 °C) gefüllt war. Das Becken wurde indirekt ausgeleuchtet (26 lx) und in vier gleichgroße Quadranten eingeteilt (Nordwest, Nordost, Südwest, Südost).

Um sich an die Testumgebung zu gewöhnen und Stress während der sich anschließenden Lernversuche zu reduzieren, durften die Mäuse 60 sec frei im Pool schwimmen (Habituation). Die Plattform wurde vorher aus dem Becken entfernt. Am

Folgetag durchlief jede Maus eine *cued* Version des MWM (4 Trials zu je 60 sec), bei welcher die Plattform deutlich sichtbar 0,5 cm oberhalb der Wasseroberfläche und mit einer kleinen Fahne markiert platziert wurde. In jedem Durchlauf wechselte die Position der Plattform in einer vorher festgelegten Reihenfolge. Die zum Erreichen der Plattform benötigte Zeit wurde gemessen und ausgewertet. Aufgabe dieses Versuchs war es, die Hippocampus-unabhängigen lokomotorischen und visuellen Fähigkeiten der Versuchstiere zu evaluieren. Um ein verfrühtes räumliches Lernen zu verhindern, wurden bei beiden Vortests die *extramaze cues* im Versuchsraum verhüllt.

In der Akquisitionsphase war die Plattform für die Mäuse unsichtbar, d.h. 0,5 cm unterhalb der Wasseroberfläche im Zentrum des Nordwest-Quadranten platziert. Jede Maus durchlief im Abstand von 6 Stunden 2 *sessions á 3* Durchläufe, in denen sie semi-randomisiert in einen der vier Quadranten abgesetzt wurde und 60 sec Zeit hatte, die Plattform zu lokalisieren. Zur besseren Orientierung standen im Versuchsraum sogenannte *extramaze cues* zur Verfügung. Mäuse, welche die Plattform nicht innerhalb einer Minute fanden, wurden sanft zur Plattform geleitet. Auf der Plattform durften die Tiere 20 sec verweilen. Zwischen den Trials setzte man die Maus für 30 sec in einen vorgewärmten Käfig (Inter-Trial-Intervall).

Eine Woche nach Abschluss der beiden *sessions* durchliefen die Versuchstiere ein *probe trial* zum Gedächtnisabruf. Hierfür wurde die Plattform entfernt und die Maus im Südost-Quadranten ins Wasser gelassen, der sich gegenüber dem vorherigen Zielquadranten befand. Der *probe trial* dauerte 60 sec.

Zur Evaluierung der Lernleistung wurden sowohl die Länge der im Wasser zurückgelegten Strecke als auch die Aufenthaltszeit in den einzelnen Quadranten analysiert. Da Versuchstiere im Verlauf von MWM-Versuchsreihen typischerweise zunehmend präzisere Suchstrategien entwickeln, wurden auch diese analysiert, um eine bessere Aussage über Hippocampus-abhängige und –unabhängige Lernprozesse zu ermöglichen.

3.6. Histologie

3.6.1. Perfusion der Tiere und Gewebepreparation

Die transkardiale Perfusion der Tiere wurde 90 min nach Abschluss der *probe trials* von Eileen Baum durchgeführt. Diese Zeitspanne wurde verwendet, um den Proteinnachweis von Zif268 zu ermöglichen (Lonergan et al. 2010).

Vor Beginn der Perfusion wurden die Tiere mit Ether narkotisiert und auf einer Plastikunterlage befestigt. Die Perfusion erfolgte mittels einer Peristaltikpumpe (Heidolph), welche über 2 min eisgekühlte PBS-Lösung und im Anschluss über 8 min eisgekühlte PFA-Fixierungslösung (90 ml 4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)) in die linke Herzkammer pumpte. Nun wurde der Kopf des Tieres entfernt und das Gehirn reseziert. Nach nächtlicher Fixierung in 4%iger PFA-Lösung wurden die Hirne für je 24 Stunden in 10%iger und 30%iger Saccharoselösung (jeweils in 0,14 mol/L PBS, 4°C) behandelt. Anschließend wurden sie in 2-Methylbutan bei -25 bis -30°C tiefgekühlt und danach bei -80°C aufbewahrt. Mit Hilfe eines Gefriermikrotom (HM 4000, Microm) wurden die Gehirne in koronaler Schnittführung und einer Schnittdicke von 40 µm präpariert. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -17° C in 24-Well Platten, welche mit Antifreeze-Lösung gefüllt waren.

3.6.2. Immunfluoreszenz-Färbung

Ziel der immunhistochemischen Färbung war eine Dreifach-Markierung von IdU, NeuN und Zif268 mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen. Ursprünglich war eine vierfach-Färbung mit zusätzlicher Kopplung von CldU mit dem Fluorochrom Dylight vorgesehen. Wir konnten hierfür kein stabiles Färbeprotokoll etablieren, sodass CldU nicht ausgewertet wurde.

Gefärbt wurde jeder 12. Hirnschnitt. Das Färbeprotokoll nahm insgesamt fünf Tage in Anspruch. Antikörper wurden grundsätzlich in TBS-Plus verdünnt (TBS + 0,1% Triton + 3% Serum (*donkey*) + 2% BSA), ü.N.-Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Am ersten Tag wurden die Schnitte in einer 12-Well Platte sechsmal für jeweils 15 min in TBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 30 min bei 37°C in 2N HCl überführt, um die DNA des Gewebes durch saure Hydrolyse zu denaturieren. Im Anschluss wurden sie 10 min mit 0,1 M Boratpuffer (pH 8.5) bei

Raumtemperatur neutralisiert. Es folgte jeweils ein Waschgang in TBS (10 min) und in TBS-T (10 min). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem anti-Mouse Fab-Fragment (donkey Fab@ms; Dianova 715-007-003; 1:20) behandelt. Nach erneutem Waschen mit TBS (3x10 min) und TBS-T (1x10min) erfolgte die Inkubation im ersten primären Antikörper zum Nachweis von IdU (ms@BrdU; BD 347580; 1:50) über Nacht (mindestens 15 Stunden) bei 4° C.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte wiederholt in TBS (3x10 min) und TBS-T (1x10min) gewaschen. Danach wurden die Schnitte ü.N. (mind. 15 h) bei 4° C im sekundären Antikörper (donkey FITC-Fab@ms, 1:50; Dianova) inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Schnittpräparate gewaschen und mit Hilfe von gekühltem Paraformaldehyd 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach folgten Waschschritte mit TBS (4x10min) und TBS-T (1x10 min). Zur Vorbereitung der Inkubation mit dem zweiten Mausantikörper wurden die Schnitte über Nacht mit anti-Maus Fab-Fragmenten blockiert (donkey@ms; Dianova 715-007-003; 1:20), um freie Epitope des ersten Mausantikörpers abzudecken.

Am vierten Tag wurden die überschüssigen Fab-Fragmente mit TBS (3x 10 min) und TBS-T (1x10 min) ausgewaschen. Im nächsten Schritt wurden die primären Antikörper zur Markierung von NeuN (ms@NeuN, 1:500; Millipore) und Zif268 (rbt@zif268; 1:250; Santa Cruz) zu den Schnitten gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Zu Beginn des fünften und letzten Färbetages wurden die Schnitte in TBS (3x10min) und TBS-T (1x10 min) gewaschen. Mithilfe des sekundären anti-Maus Antikörper (donkey Cy5@ms, 1:250) wurde NeuN mit dem Fluorochrom Cy5 markiert. Gleichzeitig erfolgte eine Kopplung des primären Zif268-Antikörpers mit einem Biotin-konjugierten Antikörper (donkey Biotin@rbt; 1:500). Die Schnitte wurden 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in TBS (je 10 min) und TBS-T (1x10 min) wurden die Schnitte in RhX-gekoppeltem Streptavidin inkubiert (1:500; Dianova). Dieser Signalamplifikationsschritt erfolgte bei Raumtemperatur und dauerte 2 Stunden. Anschließend wurden die Schnitte in TBS gewaschen (3x15 min), nachfolgend mit 0,5% Gelatine auf einen Objektträger aufgezogen und mittels Fluoromount eingedeckelt.

3.6.3. Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbung

Nach Abschluss der Färbungen wurden die Schnitte mit dem Lasermikroskop LSM 710 (Zeiss) gescannt und anschließend mittels ZEN (Version 14.0) manuell ausgewertet. Die Auswertung erfolgte verblindet. Beim Scannen wurden mit einem 40er Objektiv über die ganze Länge des ipsilateralen *Gyrus dentatus* hinweg randomisiert Bildstapel aufgenommen. Gezählt wurden alle IdU⁺-Zellen in der Subgranulärzone und der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* und vermerkt, ob diese zusätzlich Zif268 und/oder NeuN exprimierten. Als positiv galt eine Zelle, deren Farbeintensivität doppelt so hoch wie der Hintergrund war (Hilus, tangential Zone des *Gyrus dentatus*; analog zu Snyder et al., 2009).

Um absolute Zellzahlen zu erhalten, wurden die prozentualen Anteile IdU⁺/NeuN⁺- bzw. IdU⁺/NeuN⁺/Zif268⁺-Zellen der Immunfluoreszenz-Färbung mit der absoluten Zahl IdU⁺-Zellen aus Eileen Baums immunhistochemischer IdU-Färbung (3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Reaktion, Details zur Färbung siehe ihre Arbeit) multipliziert.

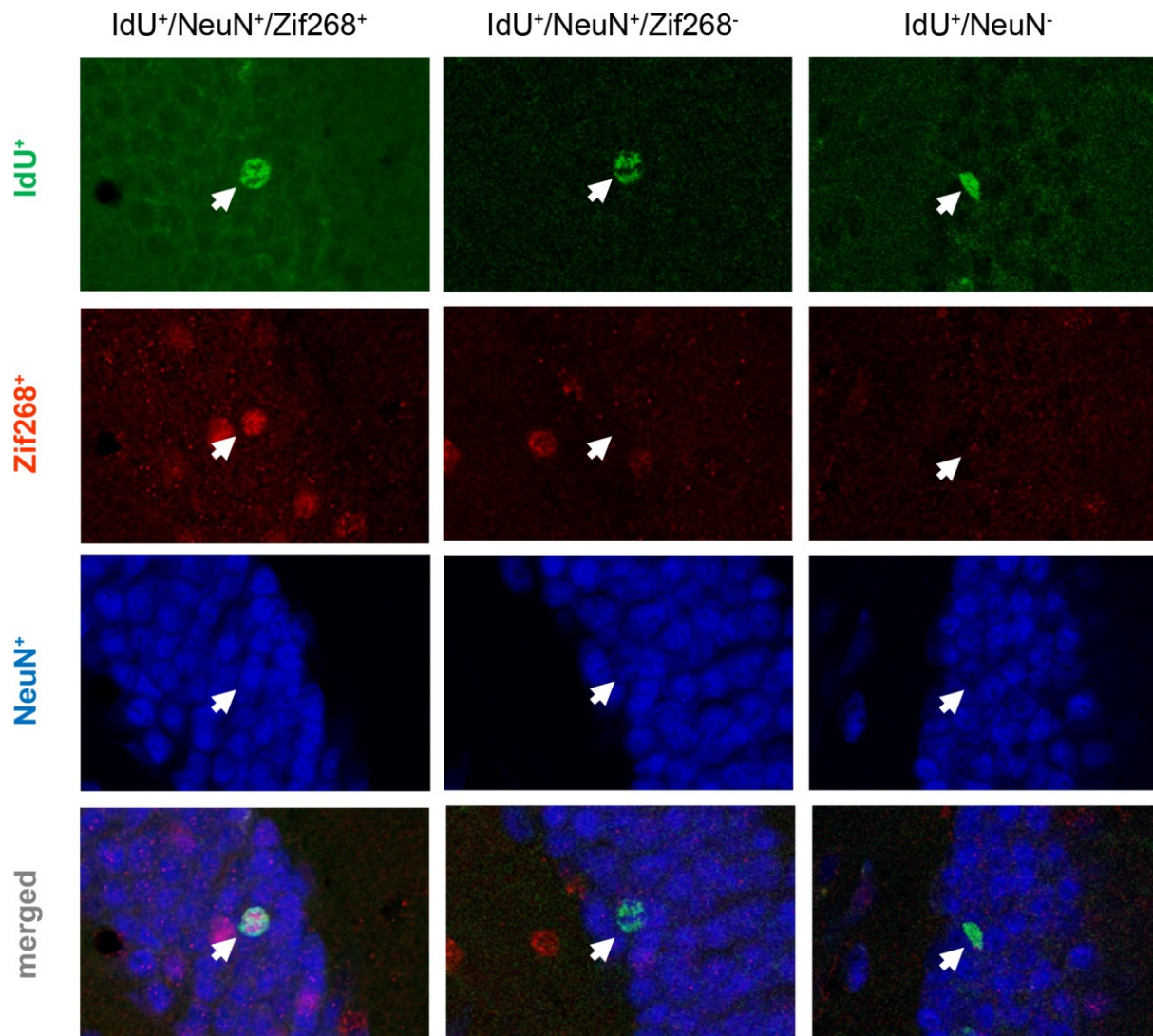


Abb. 3.3 Beispiele IdU^+ -Zellen im Gyrus dentatus der Maus. Gezählt wurden alle IdU^+ -Zellen in der Subgranulärzone und der Körnerzellschicht im Gyrus dentatus des ipsilateralen Hippocampus und vermerkt, ob diese zusätzlich Zif268 und/oder NeuN exprimierten. Als positiv galt eine Zelle, deren Färbeintensivität doppelt so hoch wie der Hintergrund war (analog zu Snyder et al., 2009).

3.6.4. Statistik zur Histologie

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism v6.01, SPSS 20 sowie Sigmaplot 13.0.

Vor Vergleich der Mittelwerte der Gruppen wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Im Falle einer Normalverteilung und gleichzeitiger Varianzhomogenität wurde bei paarweisen Vergleich der (einseitige) t-Test verwendet, bei Vergleich mehrerer Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse mit anschließendem Tukey Post-Hoc-test genutzt.

Bei nicht normalverteilten Gruppen oder fehlender Varianzhomogenität zwischen den zu vergleichenden Gruppen wurde zunächst eine logarithmische Transformierung (natürlicher Logarithmus) der Daten durchgeführt. Falls sich auch hierbei keine Normalverteilung oder Varianzhomogenität ergab, wurde bei paarweisem Vergleich der Mann-Whitney-U-Test, und beim Vergleich mehrerer Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Als statistisches Signifikanzniveau galt $p \leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Neuronale Differenzierung IdU⁺-Zellen

In der vorangegangenen Arbeit von Eileen Baum zeigte sich nach CSD sowohl mit als auch ohne Verhaltenstests eine deutlich erhöhte Anzahl IdU⁺-Zellen im ipsilateralen *Gyrus dentatus*. Um den Reifungszustand der neugeborenen Zellen zu bewerten, wurden in dieser Studie neben dem Proliferationsmarker IdU der neuronale Marker NeuN mittels Immunfluoreszenz-Färbung markiert und ausgewertet. Zur Analyse eines Einfluss des Reifegrades neugeborener Zellen auf das räumliche Gedächtnis wurden sowohl die Tiere mit Verhaltenstest (Projekt 2) als auch Tiere ohne Verhaltenstests (Projekt 3) in drei Gruppen untergliedert, die sich im Alter der neugeborenen Zellen bei Eintritt in das MWM unterschieden (2, 4 oder 6 Wochen nach IdU-Markierung). Die Zeiträume wurden so gewählt, dass wichtige Zeitfenster während der Reifung der jungen Nervenzellen untersucht werden konnten: a) die Phase gesteigerter Apoptose (1-2 Wochen), in welcher die unreifen Neurone noch nicht vollständig in das Netzwerk integriert sind; b) die Phase erhöhter Plastizität während der noch andauernden funktionellen Integration in das Netzwerk (3-4 Wochen) und c) der Zeitraum, ab welchem die neuen Körnerzellen morphologisch und physiologisch weitestgehend den umgebenden reifen Nervenzellen entsprechen (6 Wochen) (Schmidt-Hieber et al. 2004, Kee et al. 2007, Garthe et al. 2009). Weiterhin wurden native Tiere mit und ohne Verhalten analog zu Gruppe 2 in die Untersuchungen mitgeführt, um potentielle Einflüsse des operativen Eingriffs und des Handlings der Tiere während der Verhaltenstests auszuschließen.

4.1.1. Einfluss von CSD auf die neuronale Differenzierung in lernenden Tieren (Gruppen mit Verhaltenstests)

Sowohl bei den SD-Tieren als auch bei sham-operierten und nativen Tieren zeigte die Mehrheit der neugeborenen IdU⁺-Zellen eine Expression von NeuN. Im Mittel exprimierten 92–97% der neugeborenen Zellen den neuronalen Marker (siehe Abb. 4.1C), in einzelnen sham-operierten bzw. SD-behandelten Mäusen der Gruppe 1 sowie einer sham-operierten Maus der Gruppe 3 zeigten sogar alle IdU⁺-Zellen eine NeuN Expression. Weder zwischen SD/sham/nativen-Tieren noch innerhalb der Behandlungsintervalle bestanden signifikante Unterschiede. Insgesamt zeigt sich kein Einfluss von SD auf die neuronale Differenzierung neugeborener Nervenzellen.

Um die absolute Anzahl neugeborener Neurone zu ermitteln, wurden die prozentualen Werte der einzelnen Gruppen mit der Anzahl IdU⁺-Zellen aus Eileen Baums Datensatz multipliziert. In allen Behandlungsintervallen fanden sich nach SD signifikant mehr IdU⁺/NeuN⁺-Zellen als bei sham-operierten Tieren. Dabei stieg die Anzahl IdU⁺/NeuN⁺-Zellen nach zwei Wochen (Gruppe 1) auf 192%, nach vier Wochen (Gruppe 2) auf 215% und nach sechs Wochen (Gruppe 3) auf 286% der sham-Werte (G1: $p=0,001$; G2: $p=0,016$, G3: $p<0,001$). Innerhalb der verschiedenen Zeitpunkte bestanden bei SD-behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede ($p=0,112$), jedoch zeigte sich bezogen auf zunehmendes Zellalter ein positiver linearer Trend für die Anzahl der Nervenzellen ($p=0,039$). Zwischen den drei Zeitpunkten der sham-operierten Tiere fanden sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,8913$). Interessanterweise überstieg die mittlere Anzahl IdU⁺/NeuN⁺-Zellen der sham-Gruppe 2 die der nativen Tiere um 197% ($p=0,0048$) (siehe Abb. 4.1D).

4.1.2. Einfluss von CSD auf die neuronale Differenzierung unter Baseline-Bedingungen (Gruppen ohne Verhaltenstests)

Wie bei den Gruppen, welche die Verhaltenstests durchliefen, zeigte auch in Käfigkontrollen der überwiegende Anteil neugeborener Zellen eine Expression des neuronalen Markers NeuN. Dabei fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SD, sham oder nativen Tieren, weder im direkten Vergleich noch innerhalb der Behandlungsintervalle. Der Mittelwert der einzelnen Gruppen reichte von 92 bis 97%, der niedrigste Einzelwert (86,29%) zeigte sich innerhalb der SD-Gruppe 2 (vier Wochen). Wie schon bei den Verhaltensgruppen fand sich auch unter Baseline-Bedingungen kein Einfluss von SD auf die neuronale Differenzierung neugeborener Nervenzellen (siehe Abb. 4.2C).

Die Berechnung der absoluten Anzahl neugeborener Neurone erfolgte analog zu den Gruppen mit Verhaltenstests (siehe 4.1.1.). Die mittlere Anzahl IdU⁺/NeuN⁺-Zellen nach SD stieg nach zwei Wochen (Gruppe 1) auf 223%, nach vier Wochen (Gruppe 2) auf 204% und nach sechs Wochen (Gruppe 3) auf 156% der sham-Werte, wobei die Unterschiede nur zwischen Tieren der Gruppe 1 und 2 signifikant waren. (G1: $p=0,009$; G2: $p=0,007$; G3: $p=0,068$). Weder innerhalb der sham-operierten Tiere noch nach SD fanden sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Ebenso ergab sich zwischen nativen Tieren und der sham-Gruppe 2 keine signifikante Differenz ($p=0,2738$; siehe Abb. 4.2D).

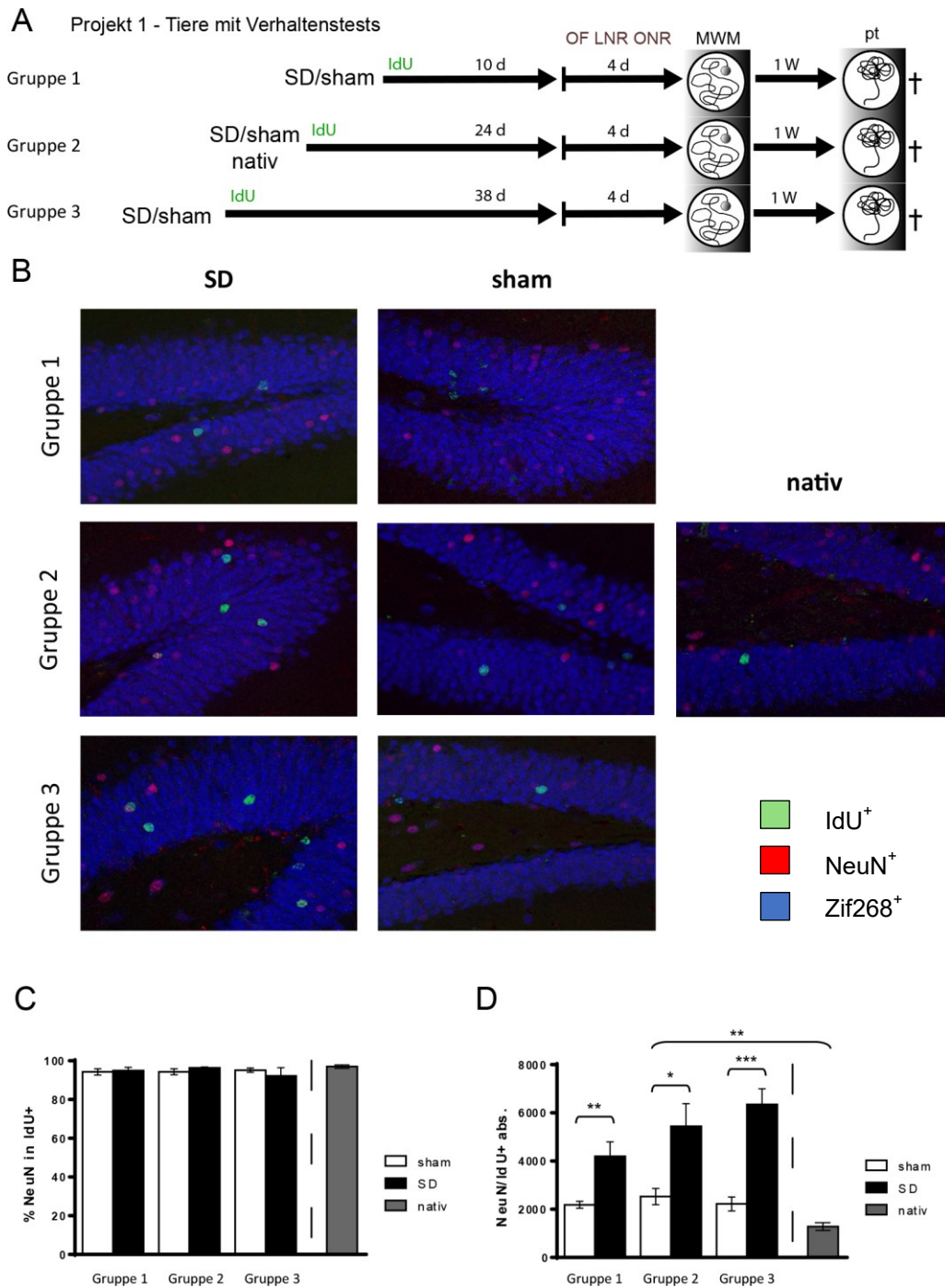


Abb. 4.1 Auswertung der IdU/NeuN⁺-Zellen bei Tieren mit Verhaltenstests (Projekt 1). A) Schematische Darstellung des experimentellen Designs. B) Mikroskopische Bilder der Immunfluoreszenz-Färbung im DG. Es ist jeweils die ipsilaterale Hemisphäre des DG in den einzelnen Gruppen dargestellt. C) Prozentualer Anteil NeuN⁺-Zellen in IdU⁺-Zellen der 3 untersuchten Gruppen sowie nativer Tiere. D) Die Absolutzahlen IdU/NeuN⁺-Zellen. (MW ± SEM, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; einseitiger t-Test bzw. Mann-Whitney sowie einfaktorielle Varianzanalyse bzw. Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Tukey-Test; SD $n = 10$, sham $n = 8$, nativ $n = 8$; Abk.: OF – open field Test, LNR – location novelty recognition-Test, ONR – object novelty recognition Test, MWM – Morris water maze, pt – probe trial/Gedächtnisabruf, DG – Gyrus dentatus; d – Tage, W – Wochen. G1 – Gruppe 1; G2 – Gruppe 2; G3 – Gruppe 3. Modifiziert nach Baum, 2016.

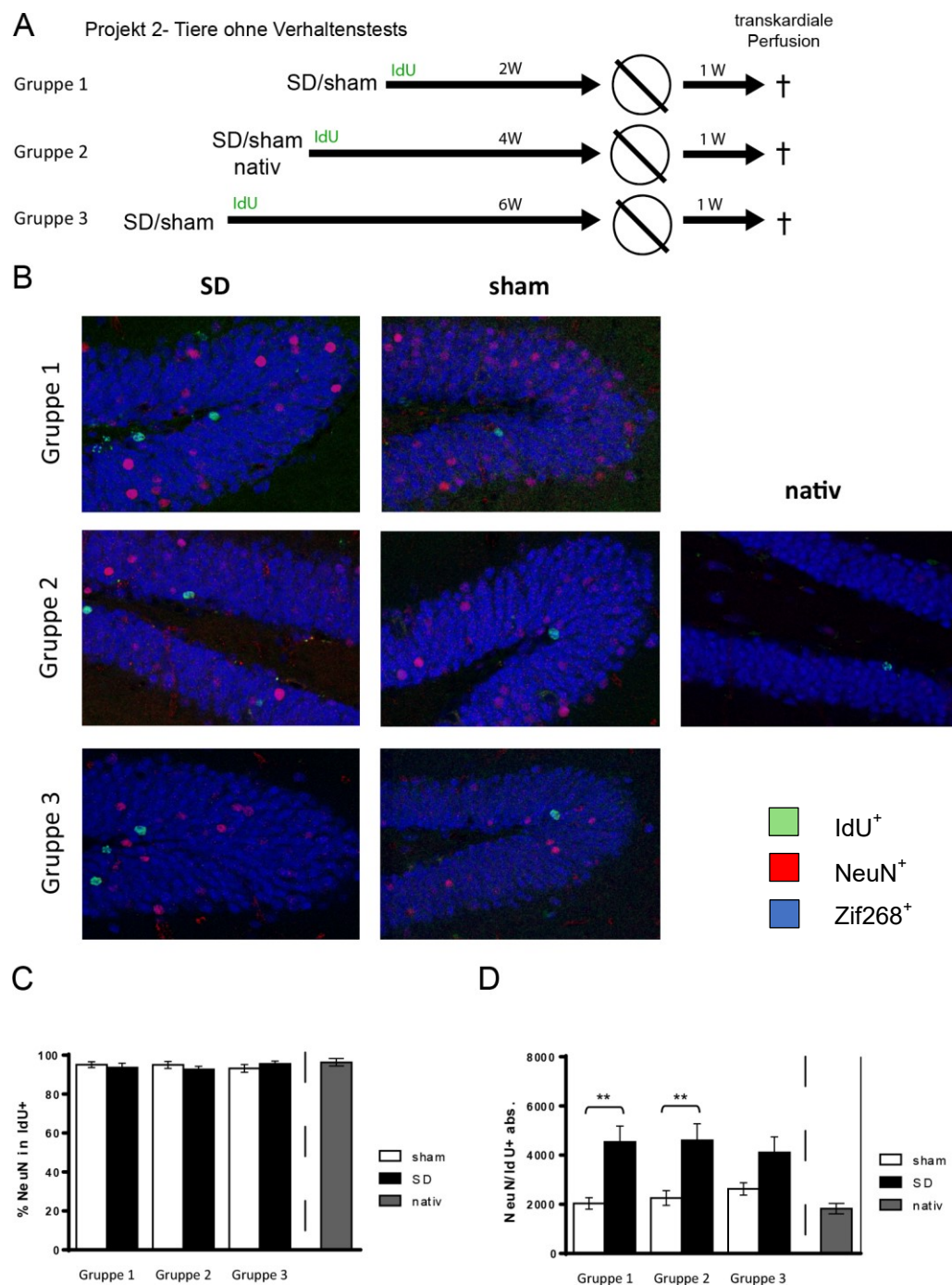


Abb. 4.2 Auswertung der IdU/NeuN⁺-Zellen bei Tieren ohne Verhaltenstests (Projekt 2). A) Schematische Darstellung des experimentellen Designs. B) Mikroskopische Bilder der Immunfluoreszenz-Färbung im DG. Es ist jeweils die ipsilaterale Hemisphäre des DG in den einzelnen Gruppen dargestellt. C) Prozentualer Anteil NeuN⁺-Zellen in IdU⁺-Zellen der 3 untersuchten Gruppen sowie nativer Tiere. D) Die Absolutzahlen IdU/NeuN⁺-Zellen. (MW ± SEM, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; einseitiger t-test bzw. Mann-Whitney sowie einfaktorielle Varianzanalyse bzw. Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Tukey-Test; SD G1: n = 6, G2: n = 8, G3: n = 7; sham G1+2: n = 5, G3 n = 10; nativ n = 5. Abk.: DG – *Gyrus dentatus*; W – Wochen. G1 – Gruppe 1; G2 – Gruppe 2; G3 – Gruppe 3. Modifiziert nach Baum, 2016.

4.1.3. Einfluss der Verhaltenstests auf die neuronale Differenzierung in SD und sham-Tieren (Gruppen mit Verhaltenstest vs. Gruppen ohne Verhaltenstest)

Wie aufgrund der o.g. homogenen Ergebnisse zu erwarten war, zeigte sich in keiner Gruppe, unabhängig ob SD, sham oder nativ, ein Einfluss der Verhaltenstests auf die neuronale Differenzierung neugeborener Zellen (siehe Abb. 4.3 A+C).

Im Vergleich der absoluten Anzahl neugeborener Neurone (siehe Abb. 4.1B+D) zeigte sich jedoch in Gruppe 3 der SD-Tiere (6 Wochen) ein positiver Einfluss der Verhaltenstests ($p=0,0311$), während alle anderen Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. In allen Untersuchungsgruppen war ein Großteil der neugeborenen Zellen im inneren Drittel der Granularzellschicht lokalisiert (siehe Abb. 4.1B + 4.2B).

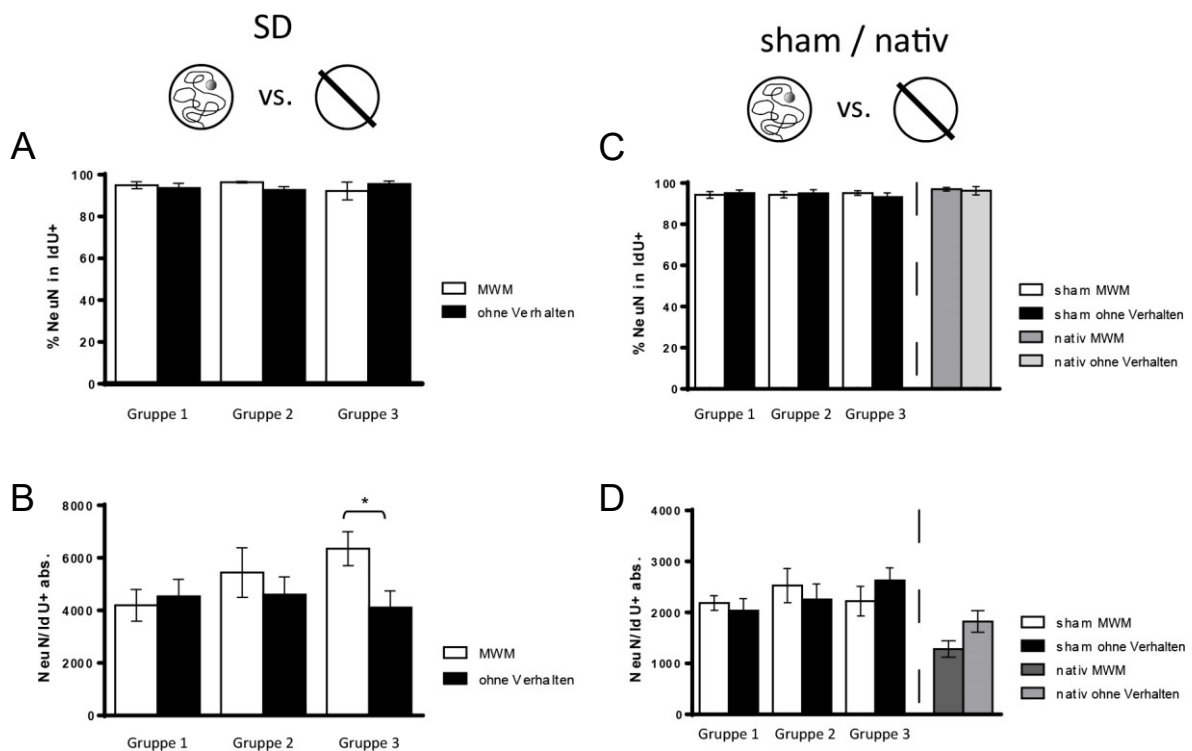


Abb. 4.3 Vergleich der IdU/NeuN⁺-Zellen zwischen Projekt 1 (Tiere mit Verhaltenstests) und Projekt 2 (Tiere ohne Verhaltenstests) A) Vergleich prozentualer Anteil NeuN⁺-Zellen in IdU⁺-Zellen der SD – Gruppen B) Vergleich absolute Anzahl IdU/NeuN⁺-Zellen der SD - Gruppen C) Vergleich prozentualer Anteil NeuN⁺-Zellen in IdU⁺-Zellen von sham-Gruppen bzw. nativen Tieren D) Vergleich absolute Anzahl IdU/NeuN⁺-Zellen von sham-Gruppen bzw. nativen Tieren. (MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; einseitiger t-test bzw. Mann-Whitney-U-Test; Abk.: MWM – Morris water maze).

4.2. Funktionelle Integration neugebildeter Nervenzellen

In den vorangegangenen Tierversuchen von Eileen Baum zeigte sich neben geringen Änderungen der Suchstrategien kein signifikanter Einfluss einer CSD auf die Leistung innerhalb des Morris-water maze (Urbach et al., 2016). Jedoch beobachtete man bei allen SD-Tieren neben einem deutlich erhöhten Explorationsverhalten im *open field* ein besseres Objektgedächtnis im *location novelty recognition*-Test. Um zu untersuchen, ob die nach CSD vermehrt nachweisbaren IdU⁺-Körnerzellen im Rahmen der Verhaltenstests rekrutiert und in bestehende neuronale Netzwerke integriert wurden und damit zur Verbesserung des räumlichen Referenzgedächtnisses beigetragen haben, analysierten wir in dieser Arbeit die Expression des *immediate early* Gens Zif268 (siehe 1.2.10). In früheren Versuchen beobachtete man eine vermehrte Expression von Zif268 etwa 60-90 min nach einem Training, sodass die Tiere in dieser Studie 90 min nach Abschluss der probe trials (MWM) perfundiert wurden (Lonergan et al. 2010).

4.2.1. Einfluss von CSD auf die Rekrutierung neugeborener Neurone beim Abruf räumlicher Gedächtnisinhalte (Gruppen mit Verhaltenstests)

Nach CSD war der Anteil Zif268⁺-neugeborener Körnerzellen in Gruppe 1 und 2 (zwei bzw. vier Wochen nach operativem Eingriff) gegenüber sham-Tieren signifikant erhöht (G1: $p=0,001$; G2: $p=0,004$). Im Mittel exprimierten 8,93% der SD-Tiere der Gruppe 1 das IEG (sham: 4,01%), in Gruppe 2 noch 5,2% (sham: 2,57%). In Gruppe 3 (sechs Wochen nach operativem Eingriff) zeigte sich in SD-Tieren eine Zif268-Positivität in 5,01% neuer Körnerzellen, jedoch war der Unterschied gegenüber der sham-Gruppe (3,44%) nicht signifikant ($p=0,118$) (siehe Abb. 4.4A). Dies deutet darauf hin, dass in den ersten Wochen nach CSD prozentual mehr neugeborene Zellen für Hippocampus-abhängige Funktionen rekrutiert werden als in den Kontrollgruppen.

Innerhalb der SD-Gruppen fand sich eine mit zunehmender Zeit sinkende Expression von Zif268 ($p<0,001$), wobei sich im nachgeschalteten post-hoc-Test nach Tukey nur zwischen Gruppe 1 und 2 (zwei und vier Wochen) bzw. Gruppe 1 und 3 (zwei und sechs Wochen) signifikante Unterschiede zeigten (G1 vs. G2: $p=0,001$; G1 vs. G3: $p<0,001$; G2 vs. G3: $p=0,978$). Bei sham-operierten Tieren wurde kein Zeiteffekt beobachtet ($p=0,409$). Weiterhin wurde kein Einfluss des operativen Eingriffs

festgestellt (nativ (3,40%) vs. sham-Gruppe 2 (2,57%): $p=0,356$). Eine Maus der sham-Gruppe 1 wurde von der Analyse ausgeschlossen, da es sich um einen deutlichen Ausreißer handelte (Grubbs; $p<0,01$).

Um absolute Zellzahlen zu erhalten, wurde der Anteil Zif268⁺-neugeborener Körnerzellen wie oben beschrieben mit den Vorergebnissen von Eileen Baums immunhistologischen Färbungen abgeglichen. In allen Behandlungsintervallen zeigten SD-Gruppen gegenüber den sham-Tieren eine signifikant erhöhte Anzahl aktivierter neuer Körnerzellen. Dabei entsprach die mittlere Anzahl Zif268⁺-neuer Körnerzellen nach zwei Wochen (Gruppe 1) 460%, nach vier Wochen (Gruppe 2) 397% und nach sechs Wochen (Gruppe 3) 458% der sham-Werte (G1: $p<0,001$; G2: $p=0,003$, G3: $p<0,001$). Weder bei SD- noch bei sham-Tieren fand sich ein signifikanter Einfluss des Zellalters (SD: $p=0,336$; sham: $p=0,789$). Auch im Vergleich der nativen Tiere mit der sham-Gruppe 2 (vier Wochen) konnte kein signifikanter Effekt der operativen Eingriffe festgestellt werden ($p=0,198$). (siehe Abb. 4.4B)

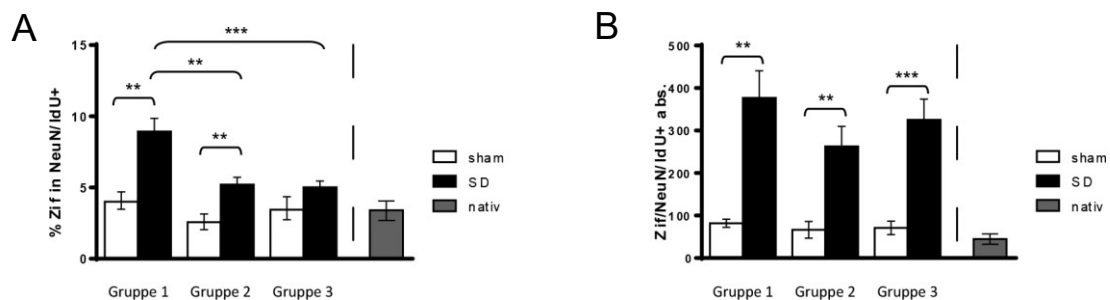


Abb. 4.4 Auswertung der Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen bei Tieren mit Verhaltenstests (Projekt 1). A) Prozentualer Anteil Zif268⁺-Zellen in NeuN/IdU⁺-Zellen der 3 untersuchten Gruppen sowie nativer Tiere B) Absolutzahlen Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen. (MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; einseitiger t-test bzw. Mann-Whitney sowie einfaktorielle Varianzanalyse bzw. Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Tukey-Test; SD n = 10, sham n = 8, nativ n = 8.

4.2.2. Gruppen ohne Verhaltenstests (Baseline-Aktivität)

Unabhängig vom Behandlungsintervall bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen SD und sham (G1: $p=0,866$, G2: $p=0,95$, G3: $p=0,28$). Überraschenderweise fanden sich in Gruppe 1 (zwei Wochen) sowohl bei SD (7,46%) als auch bei sham-Tieren (7,20%) hohe Zif268-Expressionsraten. Mit steigendem Zellalter nahm der prozentuale Anteil Zif268⁺-Neurone ab, jedoch war der negative lineare Trend nur bei sham-operierten Tieren signifikant ($p=0,038$). Bei

SD-Tieren stellte sich nach 4 Wochen ein Plateau ein (Abb. 4.5A). Zwischen der nativen Gruppe (4,86%) und sham-Gruppe 2 (5,42%) bestanden, wie schon bei den Tieren mit Verhaltenstests, keine signifikanten Unterschiede ($p=0,748$; siehe Abb. 4.5A).

Die absoluten Zellzahlen wurden analog zu 4.2.1. berechnet. Dabei wiesen SD-Tiere in allen Gruppen höhere Werte als sham-Tiere auf, jedoch war der Unterschied nur in Gruppe 1 (zwei Wochen) signifikant (G1: $p=0,017$, G2: $p=0,18$, G3: $p=0,146$). Wie für die prozentualen Werte zeigte sich auch in den Absolutzahlen aktivierter neuer Neurone kein signifikanter Unterschied zwischen nativen Tieren und sham-Tieren (vier Wochen; $p=0,435$). Der Mittelwert Zif268-exprimierender Zellen sank sowohl bei SD als auch den sham-Tieren mit steigendem Zellalter, ein signifikanter Effekt der Zeit ließ sich jedoch nicht nachweisen (SD: $p=0,545$, sham: $p=0,580$; siehe Abb. 4.5B).

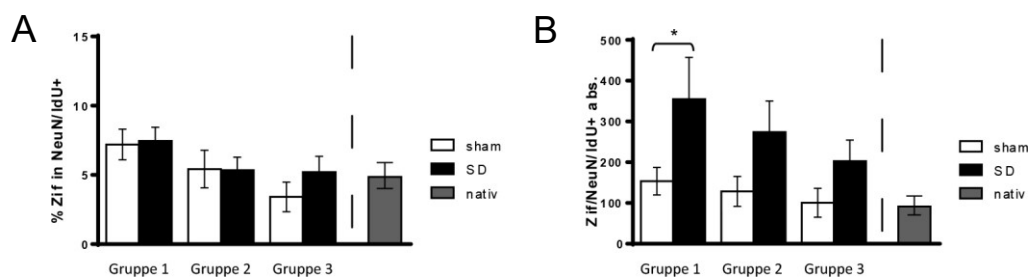


Abb. 4.5 Auswertung der Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen bei Tieren ohne Verhaltenstests (Projekt 2). A) Prozentualer Anteil Zif268⁺-Zellen in NeuN/IdU⁺-Zellen der 3 untersuchten Gruppen sowie nativer Tiere B) Die Absolutzahlen Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen. (MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$; einseitiger t-test bzw. Mann-Whitney sowie einfaktorielle Varianzanalyse bzw. Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc Tukey-Test; SD G1: $n = 6$, G2: $n = 8$, G3: $n = 7$; sham G1+2: $n = 5$, G3 $n = 10$; nativ $n = 5$).

4.2.3. Gedächtnisabruf-spezifische Rekrutierung neugeborener Nervenzellen (Gruppen mit Verhaltenstest vs. Gruppen ohne Verhaltenstest)

Zif268 wird mit neuronaler Aktivität und synaptischer Plastizität im Rahmen des hippocampalen Gedächtnisses assoziiert (siehe 1.1.8). Eine vermehrte Expression von Zif268 ist jedoch nicht zwingend nur auf Lernprozesse innerhalb eines Verhaltenstests zurückzuführen, beispielsweise kann bereits der Kontakt mit einer neuen Umgebung (z.B. einer Wasseroberfläche) unabhängig vom Lernerfolg in

jungen Neuronen zu einer gesteigerten hippocampalen Expression des Gens führen (Aimone et al. 2006, Carter et al. 2015).

In der vorliegenden Arbeit hatten Verhaltenstests bei SD-Tieren keinen signifikanten Einfluss auf die prozentuale Zif268-Expression neugeborener Körnerzellen, unabhängig vom Zellalter (G1: $p=0,32$, G2: $p=0,625$, G3: $p=0,861$; siehe Abb. 4.6A). Auch bei nativen Tieren fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Verhaltenstest und Käfigkontrollen ($p=0,236$). In Gruppe 1 und 2 (zwei bzw. vier Wochen) wiesen sham-Tiere mit Verhaltenstest sogar eine verringerte Expression von Zif268 auf, in Gruppe 3 (6 Wochen) wiederum konnte kein Unterschied zur Käfigkontrolle festgestellt werden (G1: $p=0,027$, G2: $p=0,047$, G3: $p=0,986$; siehe Abb. 4.6C).

Zieht man die absoluten Zellzahlen hinzu, zeigen sich nach Verhaltenstests sowohl in Gruppe 1 (zwei Wochen) der sham-operierten Tiere als auch bei nativen Mäusen (4 Wochen) signifikant weniger integrierte Zellen als in den Käfig-Kontrollen (jeweils $p=0,04$; siehe Abb. 4.6D). In allen anderen Gruppen bestehen nach Verhaltenstests keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl aktivierter Körnerzellen. (SD G1: $p=1,00$, G2: $p=0,896$, G3: $p=0,113$; sham G2: $p=0,13$, G3: $p=0,42$; siehe Abb. 4.6B+D).

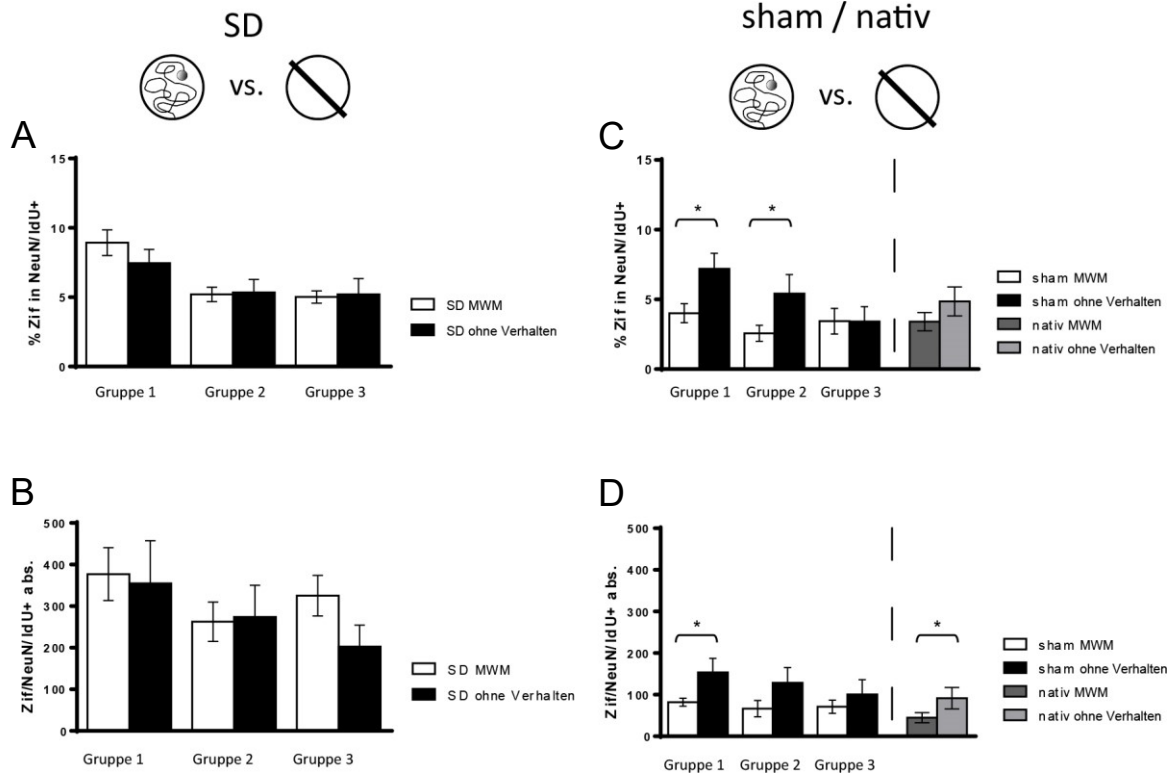


Abb. 4.6 Vergleich der Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen zwischen Projekt 1 (Tiere mit Verhaltenstests) und Projekt 2 (Tiere ohne Verhaltenstests) A) Vergleich prozentualer Anteil Zif268⁺-Zellen in NeuN/IdU⁺-Zellen der SD-Gruppen B) Vergleich absolute Anzahl Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen der SD-Gruppen C) Vergleich prozentualer Anteil Zif268⁺-Zellen in NeuN/IdU⁺-Zellen von sham-Gruppen bzw. nativen Tieren D) Vergleich absolute Anzahl Zif268/IdU/NeuN⁺-Zellen von sham-Gruppen bzw. nativen Tieren. (MW \pm SEM, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; einseitiger t-test bzw. Mann-Whitney-U-Test; Abk.: MWM – Morris water maze).

5. Diskussion

5.1. CSD nehmen keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung von neugeborenen Zellen

Zur Identifizierung neuronaler Maturierung wurde in dieser Arbeit das Protein *neuronal nuclei* (NeuN) verwendet. NeuN ist ein Produkt des Splicing-Regulators Fox-3 (Kim et al. 2009) und lässt sich *in vivo* ausschließlich in Neuronen nachweisen (Weyer und Schilling 2003, Maxeiner et al. 2014). Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass NeuN erst dann exprimiert wird, wenn die Zellen im Rahmen der neuronalen Reifung ihre Teilungsfähigkeit verloren haben und in ihre Ziellokalisation eingewandert sind (Gusel'nikova und Korzhevskiy 2015, Duan et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit exprimieren sowohl bei SD-Tieren als auch in sham-behandelten und nativen Gruppen unabhängig vom Zellalter ca. 92-97% der neugeborenen Zellen NeuN. Die Rate neuronaler Differenzierung deckt sich mit vorherigen Studien an unbehandelten Mäusen, in denen bereits nach einer Woche über 90% der neugeborenen Zellen des DG eine nukleäre Expression von NeuN aufwiesen (Brandt et al. 2003, Snyder et al. 2009b). Weiterhin beobachtete Snyder et al., dass der Anteil NeuN⁺-neugeborener Zellen auch zu späteren Zeitpunkten bis zu einem Alter von mindestens 10 Wochen nicht absinkt.

In einer vorangegangenen Studie mit C57BL/6J-Mäusen fand sich nach elektrischer Erregung des entorhinalen Kortex eine ähnliche Hochregulation der adulten Neurogenese im *Gyrus dentatus* wie nach CSD. Auch hier detektierte man keinen Einfluss der Stimulation auf die spätere neuronale Differenzierung neu gebildeter Vorläuferzellen (Stone et al. 2011a). Viel deutet darauf hin, dass die Festlegung auf eine neuronale Differenzierung ein sehr früher Schritt in der Reifung der Vorläuferzellen ist und einmal neuronal determinierte Zellen den eingeschlagenen Differenzierungspfad nicht mehr verlassen. Beispielsweise zeigt eine experimentelle Induktion von Langzeitpotenzierung schon bei 1-2 Wochen alten Zellen keinen Einfluss mehr auf die neuronale Maturierung (Kempermann et al. 2003, Bruehl-Jungerman et al. 2006).

Interessanterweise fanden Urbach et al. nach CSD im Hippocampus von Ratten eine gegenüber sham-Tieren leicht, aber signifikant erhöhte Rate neuronaler Differenzierung 6 Wochen alter neugeborener Zellen (90% vs. 85%) (Urbach et al. 2008). Aufgrund der zu früheren Zeitpunkten relativ gleichmäßigen Verteilung von DCX⁺-Vorläuferzellen vermuteten sie, dass CSD weniger die neuronale Differenzierung sondern insbesondere das Überleben junger Körnerzellen fördern. Die vorliegende Studie lieferte jedoch keinerlei Hinweise auf entsprechende CSD-Effekte in Mäusen, was möglicherweise auf Spezies-spezifische Unterschiede zurückgeführt werden kann (Brandt et al. 2003, Snyder et al. 2009b).

Zusammengenommen zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass CSD keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung neugeborener Zellen im murinen *Gyrus dentatus* hat.

5.2. CSD führen zu erhöhter Neurogenese

Wie aus vorherigen Studien bekannt ist, findet sich bei Ratten nach CSD eine deutliche Steigerung der ipsilateralen hippocampalen Neurogenese (Urbach et al. 2008). CSD führten zu einer massiven Proliferation neurogener Vorläuferzellen, welche zu reifen Körnerzellen ausdifferenzierten und sich für mindestens 6 Wochen im Hippocampus nachweisen ließen. Auch im kontralateralen *Gyrus dentatus* zeigte sich eine gering erhöhte Neurogenese.

In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie zeigte sich ebenso bei Mäusen nach Induktion von CSD ein massiver Anstieg neugeborener IdU⁺-Zellen im ipsilateralen Hippocampus (Urbach et al. 2017). Ähnliche Resultate ergaben sich in der vorliegenden Arbeit für die Anzahl neugeborener Neurone nach Phänotypisierung der IdU⁺-Zellen mittels NeuN. Hier fand sich in SD-Tieren, mit oder ohne Verhaltenstests, zu fast allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant erhöhte Anzahl neugeborener Körnerzellen im Vergleich zu sham-Tieren. Einzige Ausnahme bildeten die 6-Wochen-Tiere aus den Gruppen ohne Verhaltenstests, in denen die Neurogenese von SD-Tieren zwar gesteigert war, das Signifikanzlevel von 0.05 jedoch nicht erreicht wurde. Ein Einfluss apoptotischer Prozesse ist möglich aber unwahrscheinlich, da bei gesunden Tieren unter basalen Bedingungen ein

überwiegender Anteil neugeborener Nervenzellen bereits im Alter von 4 Tagen bzw. nach etwa 2-3 Wochen eliminiert wird und die Zellzahl nach Abschluss der vierten Woche weitestgehend stabil bleibt (Dayer et al. 2003, Snyder et al. 2009b, Sierra et al. 2010). Eine Selektion älterer neugeborener Nervenzellen findet sich nur während der postnatalen Hirnentwicklungsphase, nicht aber im adulten Hippocampus (Cahill et al. 2017). Möglicherweise lässt sich die Diskrepanz aber auch durch die relativ geringe Anzahl von Versuchstieren pro Gruppe erklären, wenngleich ein Effekt von CSD auf das Überleben der neugeborenen Zellen im vorliegenden Studiendesign nicht ausgeschlossen werden kann. Aufschluss darüber könnten beispielsweise Zusatzuntersuchungen mit Apoptosemarkern geben.

Weiterhin interessierte uns, welche Interaktionen zwischen der Anzahl neuer Nervenzellen und Hippocampus-abhängigen Lernen bestehen. In der vorliegenden Arbeit fand sich nur bei SD-Tieren, welche 6 Wochen nach CSD-Induktion ins MWM eintraten, eine höhere Anzahl neugeborener Neurone als bei den Käfigkontrollen. Da sich bei sham-Tieren kein solcher Unterschied zeigte, stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um einen Effekt der CSD, der Verhaltenstests oder einer Kombination beider Prozesse handelt.

Die bisherige Studienlage zeigt, dass Hippocampus-abhängige Verhaltenstests abhängig von verschiedenen Faktoren wie z.B. Zellalter, Lernleistung, Lernfrequenz und Schwierigkeit des Tests sowohl Einfluss auf die Proliferation von Vorläuferzellen als auch auf das Überleben junger Neurone nehmen können (siehe 1.1.7). Dupret et al. demonstrierte an Ratten, dass im MWM insbesondere 7-9 Tage alte Körnerzellen durch Apoptose eliminiert werden (Dupret et al. 2007). Ein weiteres Zeitfenster verstärkter Elimination junger Neurone von Ratten durch Hippocampus-abhängiges Lernen im MWM wurde für 11-15 Tage alte Zellen beschrieben (Epp et al. 2011). Da der neuronale Reifungsprozess bei Mäusen um etwa 1-2 Wochen verzögert ist (Snyder et al. 2009b), führt möglicherweise das Lernen im MWM insbesondere in den ersten beiden Gruppen (Zellalter bei Eintritt in Verhaltenstests 8-13 bzw. 22-27 Tage) zu einer verstärkten Elimination junger Neurone. Dazu passend fanden wir bei SD-Tieren mit Verhaltenstests eine mit zunehmendem Zellalter ansteigende Anzahl von neugeborenen Neuronen.

Eine weitere Hypothese involviert im Hilus des *Gyrus dentatus* gelegene Parvalbumin-exprimierende Korbzellen (*basket cells*). Eine aktuelle Studie zeigte,

dass reife Körnerzellen bei Mäusen über disynaptische Verbindungen mit den Korbzellen Einfluss auf die Reifung neuronaler Vorläuferzellen nehmen (Alvarez et al. 2016). Eine Aktivierung älterer Neurone führt über einen positiven GABAergen feedback-loop zum „Priming“ unreifer Neurone, d.h. es fördert die Ausbildung glutamaterger Synapsen, beschleunigt so die Verschaltung der jungen Zellen und begünstigt deren spätere Integration in bestehende neuronale Netzwerke. Wie aus vorangegangenen Studien bekannt ist, finden sich im *Gyrus dentatus* gesunder Mäuse und Ratten bis zu 4 Wochen nach Injektion von BrdU kleine Gruppen von DCX⁺-Zellen (vermutlich Typ 2 und Typ 3 – Zellen) (Brown et al. 2003, Snyder et al. 2009b), die möglicherweise nach erfolgter Einwanderung in die Granularzellschicht in Form langsam reifender oder ruhender Vorläuferzellen ihre Teilungsfähigkeit behalten und später abhängig von der Netzwerkaktivität ausdifferenzieren können (Esposito et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit ließen sich zu jedem untersuchten Zeitpunkt in der Granularzellschicht einzelne IdU⁺/NeuN⁻ - Zellen nachweisen (zwischen 3–8% der IdU⁺-Zellen), bei welchen es sich möglicherweise um eine Subpopulation von Neuroblasten handelt. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit mit steigenden Behandlungsintervall zu beobachtende lineare Progression IdU⁺-Neurone in SD-Tieren auf einen ansteigenden Pool reifender Körnerzellen zurückzuführen ist, die verbliebene IdU⁺/NeuN⁻ Vorläuferzellen „primen“ und so deren aktivitätsabhängige Ausreifung und Rekrutierung begünstigen. Gegen diese Hypothese spricht, dass die Effekte des Primings bisher nur für 9 Tage alte Vorläuferzellen nachgewiesen wurden, während sich sowohl bei jüngeren (4 Tage) als auch bei älteren Zellen (14 und 17 Tage) keine vergleichbaren Veränderungen zeigten. Zudem nutzte die genannte Studie als Stimulus ein *enriched environment* und nicht Hippocampus-abhängiges Lernen in einem Water maze (Alvarez et al. 2016). Es lässt sich weiterhin nicht befriedigend erklären, warum der zeitabhängige Anstieg ausschließlich bei SD-Tieren zu beobachten war.

Insgesamt ist die bisherige Studienlage über die Interaktion von Lernen und adulter Neurogenese jedoch kontrovers. So existieren sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen Arbeiten, die nach einem MWM oder vergleichbaren Verhaltenstests keine signifikanten Auswirkungen auf das Zellüberleben nachweisen konnten (Ehninger und Kempermann 2006, Epp et al. 2013b, Trinchero et al. 2015) und somit unseren Daten aus den sham-operierten Tieren entsprechen. Weiterhin wurden für die

55

Mehrzahl der bis dato durchgeführten Studien Ratten verwendet, während bei Mäusen über die Verknüpfung von Neurogenese und Lern- und Gedächtnisprozessen vergleichsweise wenig bekannt ist. Vieles deutet aber darauf hin, dass sich die aus Ratten gewonnenen Erkenntnisse aufgrund der speziesspezifischen Unterschiede beispielsweise in der Stressregulierung, verwendeter Suchstrategien als auch der differenten Verschaltung der Hirnregionen nicht ohne weiteres auf das Mausmodell übertragen lassen (Whishaw 1995, Snyder et al. 2009b, Epp et al. 2013a).

Zusammengenommen zeigen unsere Daten, dass CSD auch in Mäusen zu einer massiven Steigerung der Neurogenese führen. Hauptfaktor scheint hier die gesteigerte Proliferation neuraler Vorläufer zu sein (s. auch Urbach et al., 2008), wenngleich ein Effekt von CSD auf das Überleben der neugeborenen Zellen im vorliegenden Studiendesign nicht ausgeschlossen werden kann. Warum und auf welche Weise räumliches Lernen Einfluss auf das Überleben nach CSD geborener Nervenzellen nimmt, ist abschließend aber nicht vollends zu klären. Nachfolgende Versuchsreihen mit kürzer gestaffelten Zeitintervallen zwischen CSD und Verhaltenstests könnten darüber Aufschluss geben.

5.3. Mögliche Mechanismen der CSD-induzierten Steigerung adulter Neurogenese im ipsilateralen *Gyrus dentatus*

Weiterhin besteht die Frage, auf welchem Weg CSD zu einer Erhöhung der adulten Neurogenese im Hippocampus führen. Nach CSD finden sich im ipsilateralen Kortex neben vorübergehenden metabolischen und hämodynamischen Verschiebungen massive Veränderungen der Proteinsynthese und Genexpression (Somjen 2001, Urbach et al. 2006, Lauritzen et al. 2011a, Rana et al. 2012). Die bisherige Studienlage weist aber darauf hin, dass kortikale CSD *in vivo* den Hippocampus nicht direkt erreichen können (Fifkova 1964, Wernsmann et al. 2006, Urbach et al. 2008), wenngleich Untersuchungen mittels *manganese-enhanced-MRT* (MEMRI) bei Ratten nach CSD ipsilateral eine gesteigerte neurologische Aktivität in CA 1-3, dem Subiculum und dem *Gyrus dentatus* feststellten (Henning et al. 2005).

Diskutiert wird eine indirekte Aktivierung des ipsilateralen Hippocampus durch Erregung seiner Eingangsstation, dem entorhinalen Kortex (EC). Der EC, welcher in linsenzephalen Tieren nachweislich durch eine CSD erreicht wird (Wernsmann et al. 2006), ist über die temporoammonische Bahn und den Tractus perforans mit zahlreichen Regionen des *Gyrus dentatus* verschaltet (Amaral und Witter 1989, Tamamaki und Nojyo 1993, van Groen et al. 2003, Witter 2007, Li et al. 2009). Diese Hypothese wird gestützt durch Befunde, die zeigten, dass experimentelle Erregung des entorhinalen Kortex mittels elektrischer Stimulation (*deep brain stimulation*) zu einer deutlichen Steigerung der hippocampalen Neurogenese im ipsilateralen *Gyrus dentatus* führen (Stone et al. 2011a). Ebenso fanden mehrere Studien nach elektrischer Erregung der Ausgangsstation des EC, dem Tractus perforans, eine ausgeprägte Proliferation von Vorläuferzellen im *Gyrus dentatus* sowie ein vermehrtes Überleben 1-2 Wochen alter Neurone (Bruehl-Jungerman et al. 2006, Chun et al. 2006, Kitamura et al. 2010).

Über die genauen zellulären Mechanismen, die in die Steigerung der adulten hippocampalen Neurogenese nach CSD involviert sind, ist bisher nicht viel bekannt. Unmittelbar nach einer CSD lässt sich im ipsilateralen *Gyrus dentatus* eine erhöhte Transkription des IEG c-Fos nachweisen (Urbach et al. 2006). Dieses IEG wird relativ unspezifisch durch eine Reihe von physiologischen und pathologischen Stimuli exprimiert und gilt als Marker neuronaler Aktivität (Chawla et al. 2013). Bekanntermaßen kann neuronale Aktivität die adulte Neurogenese modulieren (Kempermann 2015).

Weiterhin beobachtet man nach CSD mit einer Latenz von wenigen Tagen im Hippocampus einen Anstieg der neuronalen BDNF-Level (Kawahara et al. 1997, Matsushima et al. 1998). BDNF bindet an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren neuronaler Stammzellen und nimmt Einfluss auf ihre Proliferation und Differenzierung (Pencea et al. 2001, Chen et al. 2014, Yang et al. 2015). Zudem gibt es Hinweise, dass BDNF Wachstum und Reifung GABAerger Neurone bewirkt und für die durch GABA vermittelte Modulation der Neurogenese essentiell ist (Waterhouse et al. 2012). Darüber hinaus findet sich nach CSD im Hippocampus eine vermehrte Transkription von bFGF-1 (Matsushima et al. 1998), welches an der Proliferation sowohl adulter Stammzellen als auch neuronaler Vorläuferzellen beteiligt ist (Sun et al. 2009). Es ist anzunehmen, dass noch weitere Faktoren und Signalwege, wie z.B. neuronal

freigesetztes Glutamat in die Vermittlung der vermehrten Zellproliferation und neuronalen Differenzierung im ipsilateralen *Gyrus dentatus* nach CSD involviert sind (Kawahara et al. 1997, Urbach et al. 2006).

5.4. Einfluss von CSD auf das räumliche Gedächtnis

Es existieren zahlreiche Studien, welche die Rolle der adulten Neurogenese im *Gyrus dentatus* in Lern- und Gedächtnisprozessen untersuchten (Leuner et al. 2002, Lazarov und Hollands 2016). Viel deutet darauf hin, dass neugeborene Nervenzellen im Rahmen des räumlichen Referenzgedächtnisses für die Aufnahme und Wiedergabe von Informationen benötigt werden, dabei an der Formierung einer gedanklichen Repräsentation der räumlichen Umgebung mitwirken und insbesondere dann wichtig sind, wenn eine flexible Nutzung der Erinnerungen notwendig ist (Eichenbaum 2001, Dupret et al. 2008, Koehl und Abrous 2011, Garthe et al. 2014). Einige Experimente bringen eine gesteigerte Anzahl junger Neurone mit erhöhter Performance in räumlichen Lerntests in Verbindung, bzw. zeigen, dass eine Hemmung der hippocampalen Neurogenese zu erheblichen Einschränkungen in Hippocampus-abhängigen Lern- und Gedächtnisprozessen führt (Kempermann und Gage 2002, Drapeau et al. 2003, Shors 2008, Sahay et al. 2011, Stone et al. 2011b). Andere Studien zeigen wiederum, dass eine niedrige Anzahl neugeborener Nervenzellen und eine hohe Apoptoserate junger Neurone mit besserer Leistung im MWM korrelieren (Dobrossy et al. 2003, Dupret et al. 2007).

Um zu untersuchen, ob CSD und die damit einhergehende erhöhte Anzahl neugeborener Neurone Einfluss auf Hippocampus-abhängige Lern- und Gedächtnisprozesse haben, durchliefen die Mäuse eine Reihe räumlicher Verhaltenstests unterschiedlicher Komplexität. Während sich im MWM neben subtilen Änderungen der Suchstrategien kein signifikanter Einfluss einer CSD auf die Lern- und Gedächtnisleistung messen ließ, beobachtete man bei allen SD-Tieren im *location novelty recognition-Test* (LNR) ein verbessertes Positionsgedächtnis. Eine weitere Kohorte von Mäusen (im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht) durchlief statt dem MWM ein *Barnes maze* (BM). Das *Barnes maze* ist ein Hippocampus-abhängiger Gedächtnistest, welcher ähnlich dem MWM eine Aussage über das räumliche Referenzgedächtnis von Nagetieren ermöglicht, jedoch als weniger

stressig für die Versuchstiere gilt (Harrison et al. 2009). Interessanterweise zeigten sich hier abhängig vom Zellalter unterschiedliche Effekte: Während Tiere zwei Wochen nach SD im BM eine signifikant schwächere Performance aufwiesen, fand sich nach vier Wochen eine bessere Lernleistung. Nach sechs Wochen wiederum ließen sich keine Unterschiede zwischen der sham- und SD-Gruppe feststellen (für ausführliche Daten siehe Eileen Baums Arbeit (Baum, 2016) oder unsere Veröffentlichung (Urbach et al. 2017)).

Die nach CSD erhöhte Explorationszeit am veränderten Objekt im LNR zeigte sich sowohl bei Tieren mit sehr jungen Zellen (Zellalter bei Eintritt in LNR <1 Woche) als auch bei Tieren mit reiferen Neuronen (Zellalter bei Eintritt in LNR 3-5 Wochen). Da die Erkennung räumlicher Unterschiede die hippocampale *pattern separation* involviert (Leutgeb et al. 2007, Clelland et al. 2009), neugeborene Neurone an der *pattern separation* beteiligt sind (Kropff et al. 2015) und eine erhöhte Neurogenese mit effizienterer *pattern separation* in Verbindung gebracht wird (Sahay et al. 2011), ist anzunehmen, dass die erhöhte Anzahl junger Neurone nach CSD für die gesteigerte Explorationszeit am veränderten Objekt verantwortlich ist. Jedoch ist bekannt, dass auch andere Hirnareale, wie etwa der anteriore cinguläre Kortex, in die Erkennung räumlicher Unterschiede involviert sind (Weible et al. 2009), sodass die beobachteten Verhaltensunterschiede möglicherweise auch auf kortikale Effekte der CSD zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse im *Barnes maze* lassen sich zumindest partiell mit den unterschiedlichen elektrophysiologischen Eigenschaften junger Neurone im Rahmen der neuronalen Maturierung erklären (Urbach et al. 2017). So koinzidiert die verbesserte Lernleistung im BM 3-4 Wochen nach SD- Induktion mit einem Reifestadium neugeborener Nervenzellen, in welchem sie aufgrund erhöhter Erregbarkeit, reduzierter hemmender Einflüsse und einer geringeren Schwelle für Langzeit-Potenzierung plastischer sind als umgebende ausgereifte Körnerzellen (Kee et al. 2007, Garthe et al. 2009) (Kee et al. 2007, Garthe et al. 2009) und so bevorzugt zur Aufnahme und Kodierung neuer Informationen verwendet werden können (Ge et al. 2007, Aimone und Gage 2011, Neunuebel und Knierim 2012). Nach 5-6 Wochen, wenn eine Vielzahl der jungen Neurone bereits morphologisch ausgereift und funktionell in bestehende Schaltkreise integriert sind, lassen sich

wiederum keine Unterschiede mehr zwischen sham- und SD-Tieren feststellen (Esposito et al. 2005).

Warum sich jedoch in der SD-Gruppe mit 1-2 Wochen alten Zellen signifikante Einschränkungen in der Lernleistung offenbarten, ist nicht offensichtlich. Zu diesem Zeitpunkt formieren die jungen Körnerzellen zwar schon primitive Verbindungen mit der Molekularzellschicht und der CA3-Region, sind aber laut multiplen Studien noch nicht wesentlich an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt (Esposito et al. 2005, Ge et al. 2006, Kee et al. 2007, Sun et al. 2013, Chancey et al. 2014). Auf eine mögliche Erklärung weisen unsere durchgeführten Vortests hin. Im Open-Field-Test zeigten unsere Mäuse nach CSD ein erhöhtes Explorationsverhalten. Dies ließ sich nicht eindeutig auf gesteigerte Angst oder vermehrten Stress zurückführen, sodass die eigentliche Ursache der gesteigerten Aktivität unklar bleibt (Urbach et al. 2017). Obwohl sich die Defizite im BM nur in den frühen SD-Gruppen zeigten, lässt sich spekulieren, dass die lokomotorische Unruhe auch im BM zu einem unpräziseren Suchverhalten beigetragen hat.

In anbetracht der signifikanten Effekte im BM war es etwas überraschend, dass sich im MWM nach CSD – zumindest bezogen auf klassische Parameter - keine messbaren Unterschiede zu sham-operierten Tieren ergaben, obgleich sich die Ergebnisse mit vorherigen Untersuchungen an Ratten decken, welche nach CSD im MWM ebenfalls keine erhöhte Testperformance zeigten (Urbach et al. 2008). Es ist bekannt, dass ein MWM im Vergleich zu landbasierten Verhaltenstest wie dem Barnes mazes bei Nagetieren zu einem erhöhten Stresslevel führt, was sich negativ auf das räumliche Lernen auswirken kann (Holscher 1999). In diesem Zusammenhang ist denkbar, dass das höhere Stressniveau potentielle Unterschiede in der Lernleistung zwischen SD und sham-Tieren überdeckte. Im Gegenzug dazu demonstrierten Stone et al. bei Mäusen, dass *deep brain stimulation* des EC, welche wie SD zu einer erhöhten hippocampalen Neurogenese führt, räumliches Lernen im MWM dann verbesserte, wenn die Zellen zum Testzeitpunkt 6,5 Wochen alt waren (Stone et al. 2011a). Es ist jedoch anzumerken, dass in ihren Versuchen aufgrund bilateraler Stimulation der EC beide Gyri dentati eine vermehrte Anzahl neuer Körnerzellen aufwiesen.

Auch wenn im Gedächtnisabruf des MWM keine Performance-Unterschiede zu sham-operierten Tieren bestanden, offenbarte die Analyse der Schwimmpfade bei

60

CSD-Tieren ein zum Teil unpräziseres Suchverhalten. Eine Möglichkeit ist, dass die lokomotorische Unruhe im *open field* auch im MWM den beobachteten Unterschied in den Suchstrategien bedingte. Es existieren Hinweise, dass neugeborene Nervenzellen an der Überführung neuer Informationen vom Hippocampus in kortikale Langzeitspeicher beteiligt sind und dabei durch Konkurrenz mit bereits existierenden Synapsen des Moosfasersystems zur Degradierung im Hippocampus repräsentierter Gedächtnisinhalte führen (Toni et al. 2008, Kitamura et al. 2009, Akers et al. 2014). In diesem Rahmen wird diskutiert, dass die bei sehr jungen Säugetieren beobachtete infantile Amnesie direkt auf die vorübergehend erhöhte Neurogenese reifender Gehirne zurückzuführen ist (Josselyn et al. 2012). Da zudem einzelne Studien suggerieren, dass ab einer gewissen Anzahl von neugeborenen Neuronen keine weiteren Benefits in Hippocampus-abhängigen Lernprozessen zu erwarten sind (Clelland et al. 2009), ist denkbar, dass die hohe Anzahl neuer Neurone nach CSD zu einer subtilen Störung hippocampaler Gedächtnisprozesse führte. Möglicherweise lassen sich so auch die Lerndefizite in der frühen SD-Gruppe des *Barnes maze* erklären. Insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass CSD im Kortex zu weitreichenden Änderungen beispielsweise in der neuronalen Verschaltung sowie in der Anzahl von Gliazellen führen (Takano et al. 2007, Urbach et al. 2008, Urbach et al. 2015), lässt sich zudem nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass andere, extrahippocampale Effekte der CSD für das beobachtete Verhalten mitverantwortlich sind.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass CSD zu komplexen Änderungen im Verhalten der Tiere führen und zumindest bestimmte Formen räumlichen Lernens, möglicherweise abhängig vom Schwierigkeitsgrad und Stressniveau des Verhaltenstests, erleichtern.

5.5. Neugeborene Nervenzellen nach CSD werden in bestehende neuronale Netzwerke integriert

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob die nach CSD deutlich erhöhte Neurogenese zur Bildung funktionell aktiver Nervenzellen führt, welche innerhalb hippocampaler Lern- und Gedächtnisprozesse rekrutiert werden können. Als Surrogatmarker für eine Aktivierung der neugeborenen Nervenzellen nutzten wir

Zif268, welches im Zusammenhang mit nervaler Erregung neuronal exprimiert (Farivar et al. 2004, Duclot und Kabbaj 2017b) und im *Gyrus dentatus* mit Hippocampus-abhängigen Lernen in Verbindung gebracht wird (Lyford et al. 1995, Tashiro et al. 2007, Minatohara et al. 2015).

Bei CSD-Tieren zeigten sich nach dem Gedächtnisabruf bis zu viermal mehr Zif268-exprimierende IdU⁺-Neurone als in sham-Tieren. Die Bandbreite der Zif268-Expressionsrate junger Zellen deckte sich dabei mit Ergebnissen vorangegangener Studien in C57BL/6J Mäusen (Tashiro et al. 2007, Trouche et al. 2009b, Clark et al. 2012, Huckleberry et al. 2015). Der höchste prozentuale Anteil aktivierter Zellen fand sich nach MWM in SD-Tieren der Gruppe 1. Dieselben Zellen waren zu Beginn des *Morris water maze* 8-13 Tage alt, einer Phase, in der die noch unreifen Neurone gerade beginnen, synaptische Verbindungen zu anderen Stationen des Hippocampus aufzunehmen. In diesem Alter sind die ersten präsynaptischen Eingänge bereits etabliert (Zhao et al. 2006), postsynaptische Kontakte mit CA3-Pyramidenzellen fehlen jedoch gänzlich (Toni et al. 2008), sodass Neurone dieses Alters vermutlich noch keinen Beitrag zum hippocampalen Lernen leisten. Trotzdem sind diese Zellen bereits in der Lage, nach LTP ihrer afferenten Eingänge Zif268 zu exprimieren (Bruel-Jungerman et al. 2006). Trouche et al. zeigten, dass neugeborene Neurone, welche beim Durchlaufen eines *water maze* 9 Tage alt waren, später beim Gedächtnisabruf (finale Zellalter 30 Tage) eine Zif268-Expression aufwiesen, wenngleich der Prozentsatz aktivierter Zellen in ihrer Studie nur bei 0,9% ± 0,6% lag (Trouche et al. 2009b).

Auch Snyder et al. beobachteten, dass in C57BL/6 Mäusen innerhalb der ersten Wochen nur ein kleiner Teil junger Neurone die Fähigkeit besitzen, durch räumliches Lernen aktiviert zu werden. Die Anzahl unreifer Körnerzellen, welche nach starker neuronaler Erregung (Kainat-induzierte Epilepsie) eine Zif268-Expression zeigten, war in ihren Experimenten höher als die tatsächlich durch Verhaltenstests aktivierbare Population neuer Körnerzellen. Mit fortschreitendem Zellalter steigt der Anteil durch Verhaltenstests aktivierbarer Zellen sukzessive an und erreicht nach etwa drei Wochen sein Maximum (Snyder et al. 2009b). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde in der Studie von Snyder et al. nur der dorsale *Gyrus dentatus* ausgewertet (Snyder et al. 2009b). Zwar assoziiert man vor allem den dorsalen Hippocampus bzw. *Gyrus dentatus* mit räumlichen Gedächtnisprozessen

(Fanselow und Dong 2010, Snyder et al. 2012a, Chow et al. 2013), jedoch zeigt sich auch im ventralen *Gyrus dentatus* im Zusammenhang mit Hippocampus-abhängigen Lernen eine Aktivierung junger Neurone (Gusev et al. 2005, Snyder et al. 2009a, Snyder et al. 2012a).

Im Gegensatz zu den oben zitierten Arbeiten weisen andere Studien darauf hin, dass neugeborene Zellen bei Mäusen frühestens ab einem Alter von 4 Wochen im Rahmen von hippocampalen räumlichen Lernen rekrutiert werden können (Kee et al. 2007, Marin-Burgin und Schinder 2012). Somit bleibt offen, warum bei CSD-Tieren mit Verhaltenstests gerade in der Population 21-26 Tage alter Neurone der höchste Anteil aktivierter Zellen zu sehen war. Einen Hinweis darauf geben verschiedene Experimente und Computermodelle, welche den jungen Zellen eine modulierende Funktion innerhalb hippocampaler Schaltkreise, insbesondere im Rahmen der durch den *Gyrus dentatus* realisierten Mustererkennung (*pattern separation*, *pattern integration*) zuweisen (Clelland et al. 2009, Morris et al. 2013, Chavlis und Poirazi 2017). Salvat et al. demonstrierten an Ratten, dass räumliche Verhaltenstests, welche möglicherweise *pattern separation* erfordern, in individuellen Gruppierungen von Körnerzellen zu einer aufgabenspezifischen Expression von Zif268 führen (Salvat et al. 2011).

Der hohe Anteil aktivierter IdU⁺-Neurone in den Tieren ohne Verhaltenstests - insbesondere in der Gruppe 21-26 Tage und 35-40 Tage alter Neurone steht in Kontrast zu früheren Arbeiten, welche bei Käfigkontrollen im Vergleich zu Tieren mit räumlichen Lerntests eine geringere Expressionsrate von Zif268 beobachteten (Guzowski et al. 2001, Tashiro et al. 2007, Trouche et al. 2009b, Clark et al. 2012). Interessanterweise fand eine aktuelle Studie, welche die Mauslinie C57BL/6J verwendete, in Käfigkontrollen eine im Vergleich zu Verhaltenstieren erhöhte Expression von Zif268 (Huckleberry et al. 2015). Passend zu den Daten der vorliegenden Arbeit betraf das vor allem Zellen im Alter von 3 Wochen, während 6 Wochen alte Zellen wieder vergleichsweise stärker durch Verhaltenstests aktiviert wurden. Als Ursache vermuten die Autoren den bei 3 Wochen alten Neuronen stattfindenden Wechsel von exzitatorischer zu inhibitorischer Wirkung von GABA (Tozuka et al. 2005, Ge et al. 2006) bei gleichzeitiger Unreife glutamaterger Eingänge (Esposito et al. 2005). Dies führe dazu, dass Erregungsprozesse diese

Nervenzellen eher hyperpolarisieren und bedingt so möglicherweise eine verminderte Expression von Zif268.

In einer weiteren Studie bestanden im Alter von 6 Wochen keine Unterschiede zwischen Käfigkontrollen und Tieren, welche einen einzelnen *trial* im MWM durchliefen (Snyder et al. 2012b). Insbesondere im suprapyramidalen Blatt der Käfigtiere wurden dabei vermehrt Zif268⁺-neugeborene Zellen nachgewiesen. Die Autoren dieser Arbeit diskutierten, dass die relative Erhöhung von Zif268 der im Käfig gehaltenen Tiere u.a. auf das hohe Schlafpensum und schlafbedingte Konsolidierungsprozesse des Hippocampus zurückzuführen sei, die nachweislich eine Expression von IEG in neugeborenen Nervenzellen induzieren können (Marrone et al. 2008, Snyder et al. 2012b, Akers et al. 2018).

Eine weitere Möglichkeit wäre ein negativer Einfluss des durch das MWM hervorgerufenen Stresses, der beispielsweise zu einer verminderten Expression von c-Fos führen kann (Fevurly und Spencer 2004). Die Tiere in unseren Experimenten durchliefen vor Beginn der Verhaltenstests ein *handling*, das der Gewöhnung von Tier und Experimentator diene und zur Stressreduktion in den nachfolgenden Tests führen soll. Eine geeignete Kontrollgruppe zum Ausschluss von stressbedingter Hemmung der neuronalen Aktivität wurde nicht mitgeführt.

Da einzelne Studien nach räumlichen Lernen keine Veränderung bzw. sogar eine Reduktion der globalen Expression von Zif268 im Hippocampus beobachteten (Wisden et al. 1990, Shires und Aggleton 2008), ist nicht ausgeschlossen, dass in der vorliegenden Arbeit die Verhaltenstests bzw. durch sie in Gang gesetzte Gedächtnisprozesse zu einer relativen Hemmung der Aktivität junger Neurone führten. Mehrere Studien beschreiben eine aktivitätsbedingte Suppression von Zif268 insbesondere in jungen Vorläuferzellen, welche noch den Marker Doublecortin (DCX) exprimieren (Jungenitz et al. 2014, Huckleberry et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde die Reife der neugeborenen Zellen mithilfe von NeuN bewertet, wobei bekanntermaßen gerade in den ersten vier Wochen eine signifikante Anzahl von jungen Neuronen sowohl NeuN als auch DCX aufweisen können (Snyder et al. 2009b, Kempermann 2015). Da wir keine Aussage über die genaue Zusammensetzung der Population IdU⁺/NeuN⁺-Zellen treffen können, ist nicht auszuschließen, dass in dieser Arbeit der Anteil tatsächlich ausgereifter und durch Verhaltenstests induzierbarer IdU⁺-Neurone überschätzt wurde.

Zudem ist ein Einfluss des *probe trial* denkbar. In einer Studie von Trouche et al. führte eine *mismatch situation*, in dem Fall eine erstmalige Veränderung der Plattformposition im Gedächtnisabruf eines spatial-water-maze, zu einer geringeren Rate Zif268⁺-junger Neurone. Nach wiederholter Exposition mit einer unveränderlichen Lernumgebung zeigte sich wiederum eine erhöhte Anzahl Zif268⁺-Zellen (Trouche et al. 2009b). Dazu passend beschrieben auch Snyder et al. bei unreifen Neuronen eine Hemmung der Zif268-Expression nach Exposition gegenüber neuartigen Erfahrungen (Snyder et al. 2012b). In der vorliegenden Arbeit wurde die Plattform beim Gedächtnisabruf entfernt, sodass denkbar ist, dass dieser neue räumliche Kontext zu verringerter Aktivierung im Vorfeld erregter IdU⁺-Nervenzellen führte, möglicherweise zugunsten von nachrückenden jüngeren IdU⁻-negativen-Neuronen. Die Hochregulation von Zif268 ist aber nicht ausschließlich durch Lernprozesse innerhalb eines Verhaltenstests zu erklären. Beispielsweise kann bereits eine unbekannte Umgebung oder der Kontakt mit einer Wasseroberfläche im Rahmen eines *water maze* zu einer gesteigerten Transkription des IEG führen (Aimone et al. 2006, Carter et al. 2015).

Insgesamt fällt die funktionelle Einordnung der nach CSD neugeborenen Körnerzellen innerhalb der verschiedenen Aufgaben des Hippocampus schwer. Die deutlich erhöhte Anzahl Zif268⁺/IdU⁺-Neurone bei CSD-Tieren mit und ohne Verhaltenstests zeigt, dass die gesteigerte Neurogenese zur Bildung aktivierbarer Nervenzellen führt. Unter der Maßgabe, dass eine erhöhte Zif268-Expression im *Gyrus dentatus* mit Hippocampus-abhängigen Lernen in Verbindung gebracht wird (Guzowski et al. 2001, Farina und Commins 2016) und auch junge Neurone im Rahmen Hippocampus-abhängiger Verhaltenstests aktiviert werden können (Tashiro et al. 2007, Trouche et al. 2009b, Clark et al. 2012), ist anzunehmen, dass die Zif268-Expression der IdU⁺-Zellen zumindest partiell auf den Gedächtnisabruf zurückzuführen ist. In fortführenden Studien sollte daher untersucht werden, wie sich die aktivierten Zellen auf das supra- und infrapyramidale Blatt des *Gyrus dentatus* verteilen. Vorangegangene Arbeiten beobachten in den beiden Blättern bei verschiedenen räumlichen Verhaltenstests unterschiedliche Expressionsmuster von IEG, weshalb diskutiert wird, dass sie im Rahmen hippocampaler Lern- und Gedächtnisprozesse separate Aufgaben übernehmen (Chawla et al. 2005, Ramirez-Amaya et al. 2005, Soule et al. 2008, Satvat et al. 2011, Snyder et al. 2011b). Übereinstimmend mit früheren Arbeiten von Ramirez-Amaya et al., die bei gesunden

Ratten suprapyramidal eine höhere Anzahl neugeborener Nervenzellen nachweisen konnten (Ramirez-Amaya et al. 2006), fand Eileen Baum auch in unseren Mäusen nach CSD mehr IdU⁺-Zellen im suprapyramidalen Blatt (Baum, 2016). Das supra- und infrapyramidale Blatt wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht separat ausgewertet. Um eine exaktere Analyse der Funktion neugeborener Zellen zu ermöglichen, benötigt es zudem Versuchsreihen, welche zwischen lernabhängiger und -unabhängiger Aktivierung der Neurone unterscheiden können (Bsp. Schwimmkontrollen). Da es Hinweise gibt, dass der funktionelle Beitrag junger Körnerzellen zum Teil auch ohne die Expression von IEG realisiert wird (Bramham 2010), wäre hier die Einbeziehung elektrophysiologischer Messungen sinnvoll.

6. Schlussfolgerung

Zusammengenommen zeigen unsere Daten, dass CSD auch in Mäusen zu einer massiven Steigerung der Neurogenese führen. Hauptfaktor scheint hier die gesteigerte Proliferation neuraler Vorläufer zu sein (s. auch Urbach et al., 2008), wenngleich ein Effekt von CSD auf das Überleben der neugeborenen Zellen im vorliegenden Studiendesign nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterhin zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass CSD keinen Einfluss auf die neuronale Differenzierung neugeborener Zellen im murinen *Gyrus dentatus* hat.

Darüber hinaus führen CSD zu komplexen Änderungen im Verhalten der Tiere und erleichtern zumindest bestimmte Formen räumlichen Lernens, möglicherweise abhängig vom Schwierigkeitsgrad und Stressniveau des Verhaltenstests. Warum und auf welche Weise räumliches Lernen Einfluss auf das Überleben nach CSD geborener Nervenzellen nimmt, ist abschließend aber nicht vollends zu klären. Nachfolgende Versuchsreihen mit kürzer gestaffelten Zeitintervallen zwischen CSD und Verhaltenstests könnten darüber Aufschluss geben. Um einen besseren Einblick in die nach CSD beobachteten Verhaltensunterschiede zu bekommen, wäre es für zukünftige Experimente sinnvoll, Versuchsreihen zu entwerfen, welche klar zwischen Einflüssen der erhöhten adulten Neurogenese und Hippocampus-unabhängigen Effekten unterscheiden können. Zudem sollten auch längere Zeitintervalle, z.B. 8 oder 10 Wochen nach Induktion einer SD, in die Analyse mit einbezogen werden.

Die deutlich erhöhte Anzahl Zif268⁺/IdU⁺-Neurone bei CSD-Tieren mit und ohne Verhaltenstests zeigt, dass die gesteigerte Neurogenese zur Bildung aktivierbarer Nervenzellen führt. Es wäre interessant zu wissen, wie sich die aktivierten Zellen auf das supra- und infrapyramidale Blatt des *Gyrus dentatus* verteilen, da diese im Rahmen hippocampaler Lern- und Gedächtnisprozesse separate Aufgaben übernehmen. Um eine exaktere Analyse der Funktion neugeborener Zellen zu ermöglichen, benötigt es zudem Versuchsreihen, welche zwischen lernabhängiger und -unabhängiger Aktivierung der Neurone unterscheiden können.

Abschließend gewährt die vorliegende Arbeit einen (wenn auch) kleinen Einblick in die adulte hippocampale Neurogenese und deren Rolle im komplexen System der neuronalen Plastizität.

7. Literaturverzeichnis

- Acsady L, Kali S. 2007. Models, structure, function: the transformation of cortical signals in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:577-599.
- Aimone JB, Gage FH. 2011. Modeling new neuron function: a history of using computational neuroscience to study adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33 (6):1160-1169.
- Aimone JB, Wiles J, Gage FH. 2006. Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci*, 9 (6):723-727.
- Aimone JB, Deng W, Gage FH. 2011. Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron*, 70 (4):589-596.
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. 2014. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev*, 94 (4):991-1026.
- Akers KG, Cherasse Y, Fujita Y, Srinivasan S, Sakurai T, Sakaguchi M. 2018. Concise Review: Regulatory Influence of Sleep and Epigenetics on Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive and Emotional Function. *Stem Cells*, 27 (10).
- Akers KG, Martinez-Canabal A, Restivo L, Yiu AP, De Cristofaro A, Hsiang HL, Wheeler AL, Guskjolen A, Niibori Y, Shoji H, Ohira K, Richards BA, Miyakawa T, Josselyn SA, Frankland PW. 2014. Hippocampal neurogenesis regulates forgetting during adulthood and infancy. *Science*, 344 (6184):598-602.
- Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Delandsheer E, Giuffrida R, Cesaro P. 1984. [Leao's spreading depression in the study of the relationship of central structures]. *An Acad Bras Cienc*, 56 (4):371-383.
- Altman J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135 (3509):1127-1128.
- Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 137 (4):433-457.
- Alvarez DD, Giacomini D, Yang SM, Trincherio MF, Temprana SG, Buttner KA, Beltramone N, Schinder AF. 2016. A disynaptic feedback network activated by experience promotes the integration of new granule cells. *Science*, 354 (6311):459-465.
- Amaral DG, Witter MP. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31 (3):571-591.
- Ambrogini P, Orsini L, Mancini C, Ferri P, Ciaroni S, Cuppini R. 2004. Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*, 359 (1-2):13-16.
- Amemori T, Bures J. 1990. Ketamine blockade of spreading depression: rapid development of tolerance. *Brain Res*, 519 (1-2):351-354.
- Anacker C, Cattaneo A, Luoni A, Musaelyan K, Zunszain PA, Milanese E, Rybka J, Berry A, Cirulli F, Thuret S, Price J, Riva MA, Gennarelli M, Pariante CM. 2013. Glucocorticoid-related molecular signaling pathways regulating hippocampal neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*, 38 (5):872-883.
- Anderson ML, Sisti HM, Curlik DM, 2nd, Shors TJ. 2011. Associative learning increases adult neurogenesis during a critical period. *Eur J Neurosci*, 33 (1):175-181.
- Ayata C, Lauritzen M. 2015. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev*, 95 (3):953-993.
- Bahrami S, Drablos F. 2016. Gene regulation in the immediate-early response process. *Adv Biol Regul*, 62:37-49.
- Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ. 2006. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci*, 23 (1):83-93.
- Baum E. 2016. Funktionelle Relevanz erhöhter adulter hippocampaler Neurogenese nach kortikaler Spreading Depression [unveröffentlichte Dissertation] Jena: Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena.

- Berg DA, Belnoue L, Song H, Simon A. 2013. Neurotransmitter-mediated control of neurogenesis in the adult vertebrate brain. *Development*, 140 (12):2548-2561.
- Block F. 1999. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol*, 58 (3):279-295.
- Bonaguidi MA, Song J, Ming GL, Song H. 2012. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*, 22 (5):754-761.
- Bond AM, Ming GL, Song H. 2015. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, 17 (4):385-395.
- Bozon B, Davis S, Laroche S. 2002. Regulated transcription of the immediate-early gene Zif268: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. *Hippocampus*, 12 (5):570-577.
- Bramham CR. 2010. LTP not equal Learning: Lessons from Short-Term Plasticity. *Front Behav Neurosci*, 4 (3).
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann G. 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci*, 24 (3):603-613.
- Brann JH, Firestein SJ. 2014. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front Neurosci*, 8 (182).
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. 2006. Reversible hippocampal lesions disrupt water maze performance during both recent and remote memory tests. *Learn Mem*, 13 (2):187-191.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. 2003. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol*, 467 (1):1-10.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S. 2006. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 26 (22):5888-5893.
- Bureš OB, Jiří Křivánek. 1974. The mechanism and applications of leão's spreading depression of electroencephalographic activity. *Journal of Neurobiology*, 6 (6):619-619.
- Cahill SP, Yu RQ, Green D, Todorova EV, Snyder JS. 2017. Early survival and delayed death of developmentally-born dentate gyrus neurons. *Hippocampus*, 27 (11):1155-1167.
- Canzoniere D, Farioli-Vecchioli S, Conti F, Ciotti MT, Tata AM, Augusti-Tocco G, Mattei E, Lakshmana MK, Krizhanovsky V, Reeves SA, Giovannoni R, Castano F, Servadio A, Ben-Arie N, Tirone F. 2004. Dual control of neurogenesis by PC3 through cell cycle inhibition and induction of Math1. *J Neurosci*, 24 (13):3355-3369.
- Carter SD, Mifsud KR, Reul JM. 2015. Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Front Behav Neurosci*, 9 (156).
- Castren E, Hen R. 2013. Neuronal plasticity and antidepressant actions. *Trends Neurosci*, 36 (5):259-267.
- Chancey JH, Poulsen DJ, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. 2014. Hilar mossy cells provide the first glutamatergic synapses to adult-born dentate granule cells. *J Neurosci*, 34 (6):2349-2354.
- Chase A. 2014. Traumatic brain injury: Spreading depolarization can cause secondary injury after TBI. *Nat Rev Neurol*, 10 (10):16.
- Chavlis S, Poirazi P. 2017. Pattern separation in the hippocampus through the eyes of computational modeling. *Synapse*, 71 (6):27.
- Chawla MK, Penner MR, Olson KM, Sutherland VL, Mittelman-Smith MA, Barnes CA. 2013. Spatial behavior and seizure-induced changes in c-fos mRNA expression in young and old rats. *Neurobiol Aging*, 34 (4):1184-1198.
- Chawla MK, Guzowski JF, Ramirez-Amaya V, Lipa P, Hoffman KL, Marriott LK, Worley PF, McNaughton BL, Barnes CA. 2005. Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*, 15 (5):579-586.

- Chen SQ, Cai Q, Shen YY, Cai XY, Lei HY. 2014. Combined use of NGF/BDNF/bFGF promotes proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. *Int J Dev Neurosci*, 38:74-78.
- Chow C, Epp JR, Lieblisch SE, Barha CK, Galea LA. 2013. Sex differences in neurogenesis and activation of new neurons in response to spatial learning and memory. *Psychoneuroendocrinology*, 38 (8):1236-1250.
- Chun SK, Sun W, Park JJ, Jung MW. 2006. Enhanced proliferation of progenitor cells following long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, 86 (3):322-329.
- Clark PJ, Bhattacharya TK, Miller DS, Kohman RA, DeYoung EK, Rhodes JS. 2012. New neurons generated from running are broadly recruited into neuronal activation associated with three different hippocampus-involved tasks. *Hippocampus*, 22 (9):1860-1867.
- Clelland CD, Choi M, Romberg C, Clemenson GD, Jr., Fragniere A, Tyers P, Jessberger S, Saksida LM, Barker RA, Gage FH, Bussey TJ. 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science*, 325 (5937):210-213.
- Cohen NJ, Eichenbaum H. 1993. *Memory, amnesia, and the hippocampal system*. Cambridge, MA, US: The MIT Press.
- Cui Y, Kataoka Y, Watanabe Y. 2014. Role of cortical spreading depression in the pathophysiology of migraine. *Neurosci Bull*, 30 (5):812-822.
- Curlik DM, 2nd, Shors TJ. 2011. Learning increases the survival of newborn neurons provided that learning is difficult to achieve and successful. *J Cogn Neurosci*, 23 (9):2159-2170.
- Czeh G, Aitken PG, Somjen GG. 1993. Membrane currents in CA1 pyramidal cells during spreading depression (SD) and SD-like hypoxic depolarization. *Brain Res*, 632 (1-2):195-208.
- Davis S, Bozon B, Laroche S. 2003. How necessary is the activation of the immediate early gene *zif268* in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res*, 142 (1-2):17-30.
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA. 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*, 460 (4):563-572.
- Deng W, Saxe MD, Gallina IS, Gage FH. 2009. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci*, 29 (43):13532-13542.
- Dobrossy MD, Drapeau E, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. 2003. Differential effects of learning on neurogenesis: learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol Psychiatry*, 8 (12):974-982.
- Drapeau E, Mayo W, Aurousseau C, Le Moal M, Piazza PV, Abrous DN. 2003. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (24):14385-14390.
- Dreier JP, Major S, Manning A, Woitzik J, Drenckhahn C, Steinbrink J, Tolias C, Oliveira-Ferreira AI, Fabricius M, Hartings JA, Vajkoczy P, Lauritzen M, Dirnagl U, Böhner G, Strong AJ. 2009. Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Brain*, 132 (7):1866-1881.
- Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, Yin Q. 2016. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol*, 53 (3):1637-1647.
- Duclot F, Kabbaj M. 2017a. The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci*, 11 (35).
- Duclot F, Kabbaj M. 2017b. The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11:35.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One*, 3 (4):0001959.

- Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Oliet SH, Piazza PV, Abrous DN. 2007. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol*, 5 (8):0050214.
- Ehninger D, Kempermann G. 2006. Paradoxical effects of learning the Morris water maze on adult hippocampal neurogenesis in mice may be explained by a combination of stress and physical activity. *Genes Brain Behav*, 5 (1):29-39.
- Ehninger D, Kempermann G. 2008. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 331 (1):243-250.
- Eichenbaum H. 2001. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res*, 127 (1-2):199-207.
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31 (1):47-59.
- Epp JR, Galea LA. 2009. Hippocampus-dependent strategy choice predicts low levels of cell proliferation in the dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem*, 91 (4):437-446.
- Epp JR, Spritzer MD, Galea LA. 2007. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience*, 149 (2):273-285.
- Epp JR, Haack AK, Galea LA. 2011. Activation and survival of immature neurons in the dentate gyrus with spatial memory is dependent on time of exposure to spatial learning and age of cells at examination. *Neurobiol Learn Mem*, 95 (3):316-325.
- Epp JR, Chow C, Galea LAM. 2013a. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 7:57.
- Epp JR, Chow C, Galea LA. 2013b. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci*, 7 (57).
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4 (11):1313-1317.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. 2005. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*, 25 (44):10074-10086.
- Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 18 (10):2803-2812.
- Fabricsius M, Akgoren N, Lauritzen M. 1995. Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression. *Am J Physiol*, 269 (1 Pt 2).
- Fanselow MS, Dong HW. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65 (1):7-19.
- Farina FR, Commins S. 2016. Differential expression of immediate early genes Zif268 and c-Fos in the hippocampus and prefrontal cortex following spatial learning and glutamate receptor antagonism. *Behav Brain Res*, 307:194-198.
- Farivar R, Zangenehpour S, Chaudhuri A. 2004. Cellular-resolution activity mapping of the brain using immediate-early gene expression. *Front Biosci*, 9:104-109.
- Fevurly RD, Spencer RL. 2004. Fos expression is selectively and differentially regulated by endogenous glucocorticoids in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the dentate gyrus. *J Neuroendocrinol*, 16 (12):970-979.
- Fields RD, Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298 (5593):556-562.
- Fifkova E. 1964. Spreading Eeg Depression in the Neo-, Paleo- and Archicortical Structures of the Brain of the Rat. *Physiol Bohemoslov*, 13:1-15.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci*, 6 (2):119-130.
- Fujita S, Mizoguchi N, Aoki R, Cui Y, Koshikawa N, Kobayashi M. 2016. Cytoarchitecture-Dependent Decrease in Propagation Velocity of Cortical Spreading Depression in the Rat Insular Cortex Revealed by Optical Imaging. *Cereb Cortex*, 26 (4):1580-1589.

- Gardner-Medwin AR. 1981. Possible roles of vertebrate neuroglia in potassium dynamics, spreading depression and migraine. *J Exp Biol*, 95:111-127.
- Garthe A, Behr J, Kempermann G. 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PLoS One*, 4 (5):7.
- Garthe A, Huang Z, Kaczmarek L, Filipkowski RK, Kempermann G. 2014. Not all water mazes are created equal: cyclin D2 knockout mice with constitutively suppressed adult hippocampal neurogenesis do show specific spatial learning deficits. *Genes, Brain, and Behavior*, 13 (4):357-364.
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54 (4):559-566.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439 (7076):589-593.
- Gilbert PE, Kesner RP. 2003. Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired-associate learning. *Behav Neurosci*, 117 (6):1385-1394.
- Gjedde A, Hansen AJ, Quistorff B. 1981. Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem*, 37 (4):807-812.
- Gniel HM, Martin RL. 2013. Cortical spreading depression-induced preconditioning in mouse neocortex is lamina specific. *J Neurophysiol*, 109 (12):2923-2936.
- GoodSmith D, Chen X, Wang C, Kim SH, Song H, Burgalossi A, Christian KM, Knierim JJ. 2017. Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 93 (3):677-690.
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. 1992. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 12 (9):3642-3650.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, 2 (3):260-265.
- Gould T.D, DDT, Kovacsics. 2009. *The Open Field Test*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Grafstein B. 1956. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*, 19 (2):154-171.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7 (2):42-47.
- Gusev PA, Cui C, Alkon DL, Gubin AN. 2005. Topography of Arc/Arg3.1 mRNA expression in the dorsal and ventral hippocampus induced by recent and remote spatial memory recall: dissociation of CA3 and CA1 activation. *J Neurosci*, 25 (41):9384-9397.
- Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL. 2001. Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci*, 21 (14):5089-5098.
- Haditsch U, Anderson MP, Freewoman J, Cord B, Babu H, Brakebusch C, Palmer TD. 2013. Neuronal Rac1 is required for learning-evoked neurogenesis. *J Neurosci*, 33 (30):12229-12241.
- Han J, Calvo CF, Kang TH, Baker KL, Park JH, Parras C, Levittas M, Birba U, Pibouin-Fragner L, Fragner P, Bilguvar K, Duman RS, Nurmi H, Alitalo K, Eichmann AC, Thomas JL. 2015. Vascular endothelial growth factor receptor 3 controls neural stem cell activation in mice and humans. *Cell Rep*, 10 (7):1158-1172.
- Harreveld AV, Fifková E. 1970. Glutamate release from the retina during spreading depression. *Journal of Neurobiology*, 2 (1):13-29.
- Harrison FE, Hosseini AH, McDonald MP. 2009. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res*, 198 (1):247-251.
- Hayashida M, Minoda R, Shinmyo Y, Ohta K, Tanaka H, Yumoto E. 2010. PC3 is involved in the shift from proliferation to differentiation and maturation in spiral ganglion neurons. *Neuroreport*, 21 (2):90-93.

- Henning EC, Meng X, Fisher M, Sotak CH. 2005. Visualization of cortical spreading depression using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med*, 53 (4):851-857.
- Hodge RD, Kowalczyk TD, Wolf SA, Encinas JM, Rippey C, Enikolopov G, Kempermann G, Hevner RF. 2008. Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. *J Neurosci*, 28 (14):3707-3717.
- Holscher C. 1999. Stress impairs performance in spatial water maze learning tasks. *Behav Brain Res*, 100 (1-2):225-235.
- Huckleberry KA, Kane GA, Mathis RJ, Cook SG, Clutton JE, Drew MR. 2015. Behavioral experience induces zif268 expression in mature granule cells but suppresses its expression in immature granule cells. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9:118.
- Hunsaker MR, Mooy GG, Swift JS, Kesner RP. 2007. Dissociations of the medial and lateral perforant path projections into dorsal DG, CA3, and CA1 for spatial and nonspatial (visual object) information processing. *Behav Neurosci*, 121 (4):742-750.
- Ishizuka N, Weber J, Amaral DG. 1990. Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, 295 (4):580-623.
- Ito HT. 2018. Prefrontal-hippocampal interactions for spatial navigation. *Neurosci Res*, 129:2-7.
- Jinde S, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Pickel J, Kohno K, Belforte JE, Nakazawa K. 2012. Hilar mossy cell degeneration causes transient dentate granule cell hyperexcitability and impaired pattern separation. *Neuron*, 76 (6):1189-1200.
- Jungenitz T, Radic T, Jedlicka P, Schwarzacher SW. 2014. High-frequency stimulation induces gradual immediate early gene expression in maturing adult-generated hippocampal granule cells. *Cereb Cortex*, 24 (7):1845-1857.
- Kallai J, Makany T, Karadi K, Jacobs WJ. 2005. Spatial orientation strategies in Morris-type virtual water task for humans. *Behav Brain Res*, 159 (2):187-196.
- Kawahara N, Croll SD, Wiegand SJ, Klatzo I. 1997. Cortical spreading depression induces long-term alterations of BDNF levels in cortex and hippocampus distinct from lesion effects: implications for ischemic tolerance. *Neurosci Res*, 29 (1):37-47.
- Kawahara N, Ruetzler CA, Mies G, Klatzo I. 1999. Cortical spreading depression increases protein synthesis and upregulates basic fibroblast growth factor. *Exp Neurol*, 158 (1):27-36.
- Kee N, Teixeira CM, Wang AH, Frankland PW. 2007. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 10 (3):355-362.
- Kempermann G. 2015. Activity Dependency and Aging in the Regulation of Adult Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (11).
- Kempermann G, Gage FH. 2002. Genetic determinants of adult hippocampal neurogenesis correlate with acquisition, but not probe trial performance, in the water maze task. *Eur J Neurosci*, 16 (1):129-136.
- Kempermann G, Song H, Gage FH. 2015. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7 (9):a018812.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27 (8):447-452.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130 (2):391-399.
- Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. 2009. Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *J Biol Chem*, 284 (45):31052-31061.
- Kirby ED, Kuwahara AA, Messer RL, Wyss-Coray T. 2015. Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (13):4128-4133.

- Kitamura T, Saitoh Y, Murayama A, Sugiyama H, Inokuchi K. 2010. LTP induction within a narrow critical period of immature stages enhances the survival of newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus. *Mol Brain*, 3 (13):1756-6606.
- Kitamura T, Saitoh Y, Takashima N, Murayama A, Niibori Y, Ageta H, Sekiguchi M, Sugiyama H, Inokuchi K. 2009. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. *Cell*, 139 (4):814-827.
- Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H. 2011. Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem*, 18 (9):605-609.
- Kocher M. 1990. Metabolic and hemodynamic activation of postischemic rat brain by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10 (4):564-571.
- Koehl M, Abrous DN. 2011. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 33 (6):1101-1114.
- Kraig RP, Nicholson C. 1978. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience*, 3 (11):1045-1059.
- Kropff E, Yang SM, Schinder AF. 2015. Dynamic role of adult-born dentate granule cells in memory processing. *Curr Opin Neurobiol*, 35:21-26.
- Kubik S, Miyashita T, Guzowski JF. 2007. Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem*, 14 (11):758-770.
- Kunze A, Congreso MR, Hartmann C, Wallraff-Beck A, Huttmann K, Bedner P, Requardt R, Seifert G, Redecker C, Willecke K, Hofmann A, Pfeifer A, Theis M, Steinhauser C. 2009. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (27):11336-11341.
- Kuzumaki N, Ikegami D, Tamura R, Hareyama N, Imai S, Narita M, Torigoe K, Niikura K, Takeshima H, Ando T, Igarashi K, Kanno J, Ushijima T, Suzuki T. 2011. Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus*, 21 (2):127-132.
- Lacefield CO, Itskov V, Reardon T, Hen R, Gordon JA. 2012. Effects of adult-generated granule cells on coordinated network activity in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 22 (1):106-116.
- Laplagne DA, Kamienkowski JE, Esposito MS, Piatti VC, Zhao C, Gage FH, Schinder AF. 2007. Similar GABAergic inputs in dentate granule cells born during embryonic and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 25 (10):2973-2981.
- Largo C, Ibarz JM, Herreras O. 1997. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J Neurophysiol*, 78 (1):295-307.
- Lauritzen M. 1984. Long-lasting reduction of cortical blood flow of the brain after spreading depression with preserved autoregulation and impaired CO₂ response. *J Cereb Blood Flow Metab*, 4 (4):546-554.
- Lauritzen M. 1987. Cerebral blood flow in migraine and cortical spreading depression. *Acta Neurol Scand Suppl*, 113:1-40.
- Lauritzen M, Hansen AJ. 1992. The effect of glutamate receptor blockade on anoxic depolarization and cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 12 (2):223-229.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. 2011a. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31 (1):17-35.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. 2011b. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31 (1):17-35.
- Lazarov O, Hollands C. 2016. Hippocampal neurogenesis: learning to remember. *Progress in neurobiology*, 138-140:1-18.

- Leão. 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. . J Neurophysiol, 7:359-390.
- Lee WH, Bondy C. 1993. Induction of EGR1/NGFI-A Gene Expression by Spreading Depression and Focal Cerebral Ischemia. Mol Cell Neurosci, 4 (3):225-230.
- Lemaire V, Tronel S, Montaron MF, Fabre A, Dugast E, Abrous DN. 2012. Long-lasting plasticity of hippocampal adult-born neurons. J Neurosci, 32 (9):3101-3108.
- Leuner B, Gould E, Shors TJ. 2002. Is There A Link Between Adult Neurogenesis and Learning? Hippocampus, 12 (5):578-584.
- Leuner B, Waddell J, Gould E, Shors TJ. 2006. Temporal discontiguity is neither necessary nor sufficient for learning-induced effects on adult neurogenesis. J Neurosci, 26 (52):13437-13442.
- Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, Moser EI. 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. Science, 315 (5814):961-966.
- Li Y, Mu Y, Gage FH. 2009. Development of neural circuits in the adult hippocampus. Curr Top Dev Biol, 87:149-174.
- Lian XY, Stringer JL. 2004. Astrocytes contribute to regulation of extracellular calcium and potassium in the rat cerebral cortex during spreading depression. Brain Res, 25:1-2.
- Lonergan ME, Gafford GM, Jarome TJ, Helmstetter FJ. 2010. Time-Dependent Expression of Arc and Zif268 after Acquisition of Fear Conditioning. Neural Plasticity, 2010:139891.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF. 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. Neuron, 14 (2):433-445.
- Manns JR, Eichenbaum H. 2006. Evolution of declarative memory. Hippocampus, 16 (9):795-808.
- Marin-Burgin A, Schinder AF. 2012. Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning. Behav Brain Res, 227 (2):391-399.
- Marlatt MW, Potter MC, Lucassen PJ, van Praag H. 2012. Running throughout middle-age improves memory function, hippocampal neurogenesis, and BDNF levels in female C57BL/6J mice. Dev Neurobiol, 72 (6):943-952.
- Marrannes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A. 1988. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. Brain Res, 457 (2):226-240.
- Marrone DF, Schaner MJ, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA. 2008. Immediate-early gene expression at rest recapitulates recent experience. J Neurosci, 28 (5):1030-1033.
- Martens-Mantai T, Speckmann EJ, Gorji A. 2014. Propagation of cortical spreading depression into the hippocampus: The role of the entorhinal cortex. Synapse, 22 (10):21769.
- Matsushima K, Schmidt-Kastner R, Hogan MJ, Hakim AM. 1998. Cortical spreading depression activates trophic factor expression in neurons and astrocytes and protects against subsequent focal brain ischemia. Brain Res, 807 (1-2):47-60.
- Maxeiner S, Glassmann A, Kao HT, Schilling K. 2014. The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron-specific splicing regulator, Rbfox3. Histochem Cell Biol, 141 (1):43-55.
- Mazel T, Richter F, Vargova L, Sykova E. 2002. Changes in extracellular space volume and geometry induced by cortical spreading depression in immature and adult rats. Physiol Res, 51 (1):S85-93.
- McAvoy K, Besnard A, Sahay A. 2015. Adult hippocampal neurogenesis and pattern separation in DG: a role for feedback inhibition in modulating sparseness to govern population-based coding. Front Syst Neurosci, 9 (120).
- McNaughton BL, Barnes CA, Meltzer J, Sutherland RJ. 1989. Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. Exp Brain Res, 76 (3):485-496.

- Mies G, Paschen W. 1984. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. *Exp Neurol*, 84 (2):249-258.
- Minatohara K, Akiyoshi M, Okuno H. 2015. Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8:78.
- Morris AM, Curtis BJ, Churchwell JC, Maasberg DW, Kesner RP. 2013. Temporal associations for spatial events: the role of the dentate gyrus. *Behav Brain Res*, 256:250-256.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11 (1):47-60.
- Morris RG. 2006. Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci*, 23 (11):2829-2846.
- Mun-Bryce S, Roberts L, Bartolo A, Okada Y. 2006. Transhemispheric depolarizations persist in the intracerebral hemorrhage swine brain following corpus callosal transection. *Brain Res*, 16:1073-1074.
- Myers CE, Scharfman HE. 2009. A role for hilar cells in pattern separation in the dentate gyrus: a computational approach. *Hippocampus*, 19 (4):321-337.
- Neunuebel JP, Knierim JJ. 2012. Spatial firing correlates of physiologically distinct cell types of the rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 32 (11):3848-3858.
- Neunuebel JP, Knierim JJ. 2014. CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron*, 81 (2):416-427.
- Nilsson M, Perfilieva E, Johansson U, Orwar O, Eriksson PS. 1999. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J Neurobiol*, 39 (4):569-578.
- O'Keefe J, Conway DH. 1978. Hippocampal place units in the freely moving rat: why they fire where they fire. *Exp Brain Res*, 31 (4):573-590.
- Obrenovitch TP, Zilkha E. 1995. High extracellular potassium, and not extracellular glutamate, is required for the propagation of spreading depression. *J Neurophysiol*, 73 (5):2107-2114.
- Obrenovitch TP, Zilkha E, Urenjak J. 1996. Evidence against high extracellular glutamate promoting the elicitation of spreading depression by potassium. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (5):923-931.
- Okada S, Igata H, Sasaki T, Ikegaya Y. 2017. Spatial Representation of Hippocampal Place Cells in a T-Maze with an Aversive Stimulation. *Frontiers in Neural Circuits*, 11:101.
- Opitz B. 2014. Memory function and the hippocampus. *Front Neurol Neurosci*, 34:51-59.
- Otori T, Greenberg JH, Welsh FA. 2003. Cortical spreading depression causes a long-lasting decrease in cerebral blood flow and induces tolerance to permanent focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23 (1):43-50.
- Pallotto M, Deprez F. 2014. Regulation of adult neurogenesis by GABAergic transmission: signaling beyond GABA(A)-receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8:166.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*, 425 (4):479-494.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. 2001. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci*, 21 (17):6706-6717.
- Peters O, Schipke CG, Hashimoto Y, Kettenmann H. 2003. Different mechanisms promote astrocyte Ca²⁺ waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J Neurosci*, 23 (30):9888-9896.
- Piatti VC, Davies-Sala MG, Esposito MS, Mongiat LA, Trinchero MF, Schinder AF. 2011. The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. *J Neurosci*, 31 (21):7715-7728.

- Pietrobon D, Moskowitz MA. 2014. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nat Rev Neurosci*, 15 (6):379-393.
- Piilgaard H, Lauritzen M. 2009. Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29 (9):1517-1527.
- Rajakumar JAKR. 2013. Barr's The Human Nervous System: An Anatomical Viewpoint. 10th Aufl.: Lippincott Williams&Wilki.
- Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA. 2006. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci*, 26 (47):12237-12241.
- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA. 2005. Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *J Neurosci*, 25 (7):1761-1768.
- Rana G, Donizetti A, Virelli G, Piscopo M, Viggiano E, De Luca B, Fucci L. 2012. Cortical spreading depression differentially affects lysine methylation of H3 histone at neuroprotective genes and retrotransposon sequences. *Brain Res*, 27:113-119.
- Renzel R, Sadek AR, Chang CH, Gray WP, Seifert G, Steinhäuser C. 2013. Polarized distribution of AMPA, but not GABAA , receptors in radial glia-like cells of the adult dentate gyrus. *Glia*, 61 (7):1146-1154.
- Sahay A, Scobie KN, Hill AS, O'Carroll CM, Kheirbek MA, Burghardt NS, Fenton AA, Dranovsky A, Hen R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472 (7344):466-470.
- Sato S, Kawauchi S, Okuda W, Nishidate I, Nawashiro H, Tsumatori G. 2014. Real-Time Optical Diagnosis of the Rat Brain Exposed to a Laser-Induced Shock Wave: Observation of Spreading Depolarization, Vasoconstriction and Hypoxemia-Oligemia. *PLoS ONE*, 9 (1):e82891.
- Satvat E, Schmidt B, Argraves M, Marrone DF, Markus EJ. 2011. Changes in task demands alter the pattern of zif268 expression in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 31 (19):7163-7167.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR. 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (46):17501-17506.
- Scharfman HE. 2007. The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:627-637.
- Scheller KJ, Tegtmeier F. 1993. On the role of excitatory amino acids during generation and propagation of spreading depression. *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment*:355-366.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429 (6988):184-187.
- Schock SC, Leblanc D, Hakim AM, Thompson CS. 2008. ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 368 (1):138-144.
- Shires KL, Aggleton JP. 2008. Mapping immediate-early gene activity in the rat after place learning in a water-maze: the importance of matched control conditions. *Eur J Neurosci*, 28 (5):982-996.
- Shors TJ. 2008. From stem cells to grandmother cells: how neurogenesis relates to learning and memory. *Cell Stem Cell*, 3 (3):253-258.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12 (5):578-584.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410 (6826):372-376.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell stem cell*, 7 (4):483-495.

- Sisti HM, Glass AL, Shors TJ. 2007. Neurogenesis and the spacing effect: learning over time enhances memory and the survival of new neurons. *Learn Mem*, 14 (5):368-375.
- Smith GK, Kesner RP, Korenberg JR. 2014. Dentate gyrus mediates cognitive function in the Ts65Dn/DnJ mouse model of Down syndrome. *Hippocampus*, 24 (3):354-362.
- Snyder JS, Ferrante SC, Cameron HA. 2012a. Late maturation of adult-born neurons in the temporal dentate gyrus. *PLoS One*, 7 (11):7.
- Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA. 2009a. Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, 19 (4):360-370.
- Snyder JS, Clifford MA, Jeurling SI, Cameron HA. 2012b. Complementary activation of hippocampal-cortical subregions and immature neurons following chronic training in single and multiple context versions of the water maze. *Behavioural Brain Research*, 227 (2):330-339.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. 2011a. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 476 (7361):458-461.
- Snyder JS, Ramchand P, Rabbett S, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA. 2011b. Septo-temporal gradients of neurogenesis and activity in 13-month-old rats. *Neurobiol Aging*, 32 (6):1149-1156.
- Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA. 2009b. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci*, 29 (46):14484-14495.
- Somjen GG. 2001. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev*, 81 (3):1065-1096.
- Soule J, Penke Z, Kanhema T, Alme MN, Laroche S, Bramham CR. 2008. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast*, 269097 (10):26.
- Stone SS, Teixeira CM, Devito LM, Zaslavsky K, Josselyn SA, Lozano AM, Frankland PW. 2011a. Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *J Neurosci*, 31 (38):13469-13484.
- Stone SS, Teixeira CM, Zaslavsky K, Wheeler AL, Martinez-Canabal A, Wang AH, Sakaguchi M, Lozano AM, Frankland PW. 2011b. Functional convergence of developmentally and adult-generated granule cells in dentate gyrus circuits supporting hippocampus-dependent memory. *Hippocampus*, 21 (12):1348-1362.
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. 2007. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 1 (5):515-528.
- Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, Zhou Z, Altememi N, Hagood S, Hamm R, Colello RJ. 2009. Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 216 (1):56-65.
- Sun GJ, Sailor KA, Mahmood QA, Chavali N, Christian KM, Song H, Ming GL. 2013. Seamless reconstruction of intact adult-born neurons by serial end-block imaging reveals complex axonal guidance and development in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 33 (28):11400-11411.
- Szirmai I, Buzsaki G, Kamondi A. 2012. 120 years of hippocampal Schaffer collaterals. *Hippocampus*, 22 (7):1508-1516.
- Taga K, Patel PM, Drummond JC, Cole DJ, Kelly PJ. 1997. Transient neuronal depolarization induces tolerance to subsequent forebrain ischemia in rats. *Anesthesiology*, 87 (4):918-925.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Lovatt D, Hansen AJ, Kasischke KA, Nedergaard M. 2007. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat Neurosci*, 10 (6):754-762.
- Tamamaki N, Nojyo Y. 1993. Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus*, 3 (4):471-480.

- Tashiro A, Makino H, Gage FH. 2007. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci*, 27 (12):3252-3259.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. 2006. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*, 442 (7105):929-933.
- Tauk DL, Nadler JV. 1985. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci*, 5 (4):1016-1022.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF. 2008. Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci*, 11 (8):901-907.
- Tozuka Y, Fukuda S, Namba T, Seki T, Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, 47 (6):803-815.
- Trinchero MF, Koehl M, Bechakra M, Delage P, Charrier V, Grosjean N, Ladeveze E, Schinder AF, Abrous DN. 2015. Effects of spaced learning in the water maze on development of dentate granule cells generated in adult mice. *Hippocampus*, 25 (11):1314-1326.
- Trouche S, Bontempi B, Roullet P, Rampon C. 2009a. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (14):5919-5924.
- Trouche S, Bontempi B, Roullet P, Rampon C. 2009b. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (14):5919-5924.
- Tullai JW, Schaffer ME, Mullenbrock S, Sholder G, Kasif S, Cooper GM. 2007. Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *J Biol Chem*, 282 (33):23981-23995.
- Tulving E, Markowitsch HJ. 1998. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8 (3):198-204.
- Urbach A, Bruehl C, Witte OW. 2006. Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *Eur J Neurosci*, 24 (3):841-856.
- Urbach A, Redecker C, Witte OW. 2008. Induction of neurogenesis in the adult dentate gyrus by cortical spreading depression. *Stroke*, 39 (11):3064-3072.
- Urbach A, Brueckner J, Witte OW. 2015. Cortical spreading depolarization stimulates gliogenesis in the rat entorhinal cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 35 (4):576-582.
- Urbach A, Baum E, Braun F, Witte OW. 2017. Cortical spreading depolarization increases adult neurogenesis, and alters behavior and hippocampus-dependent memory in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 37 (5):1776-1790.
- van Groen T, Miettinen P, Kadish I. 2003. The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*, 13 (1):133-149.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH. 1999a. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*, 2 (3):266-270.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. 1999b. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (23):13427-13431.
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*, 10 (4):272-282.
- Veyrac A, Gros A, Bruel-Jungerman E, Rochefort C, Kleine Borgmann FB, Jessberger S, Laroche S. 2013. Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (17):7062-7067.

- Viggiano E, Viggiano D, Viggiano A, De Luca B, Monda M. 2014. Cortical spreading depression increases the phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the cerebral cortex. *Neurochem Res*, 39 (12):2431-2439.
- Vinogradova LV, Koroleva VI, Bures J. 1991. Re-entry waves of Leao's spreading depression between neocortex and caudate nucleus. *Brain Res*, 538 (1):161-164.
- Vorhees CV, Williams MT. 2006a. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc*, 1 (2):848-858.
- Vorhees CV, Williams MT. 2006b. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*, 1 (2):848-858.
- Vukovic J, Colditz MJ, Blackmore DG, Ruitenber MJ, Bartlett PF. 2012. Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J Neurosci*, 32 (19):6435-6443.
- Waterhouse EG, An JJ, Orefice LL, Baydyuk M, Liao GY, Zheng K, Lu B, Xu B. 2012. BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci*, 32 (41):14318-14330.
- Weible AP, Rowland DC, Pang R, Kentros C. 2009. Neural correlates of novel object and novel location recognition behavior in the mouse anterior cingulate cortex. *J Neurophysiol*, 102 (4):2055-2068.
- Wernsmann B, Pape HC, Speckmann EJ, Gorji A. 2006. Effect of cortical spreading depression on synaptic transmission of rat hippocampal tissues. *Eur J Neurosci*, 23 (5):1103-1110.
- Weyer A, Schilling K. 2003. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res*, 73 (3):400-409.
- Whishaw IQ. 1995. A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol Behav*, 58 (4):687-693.
- Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TV, Hunt SP. 1990. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron*, 4 (4):603-614.
- Witter MP. 2007. The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163:43-61.
- Xu L, Tang X, Wang Y, Xu H, Fan X. 2015. Radial glia, the keystone of the development of the hippocampal dentate gyrus. *Mol Neurobiol*, 51 (1):131-141.
- Yanamoto H, Nagata I, Sakata M, Zhang Z, Tohnai N, Sakai H, Kikuchi H. 2000. Infarct tolerance induced by intra-cerebral infusion of recombinant brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res*, 859 (2):240-248.
- Yang G, Song Y, Zhou X, Deng Y, Liu T, Weng G, Yu D, Pan S. 2015. DNA methyltransferase 3, a target of microRNA-29c, contributes to neuronal proliferation by regulating the expression of brain-derived neurotrophic factor. *Mol Med Rep*, 12 (1):1435-1442.
- Yassa MA, Stark CEL. 2011. Pattern separation in the hippocampus. *Trends in neurosciences*, 34 (10):515-525.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH. 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*, 26 (1):3-11.
- Zhou N, Rungta RL, Malik A, Han H, Wu DC, MacVicar BA. 2013. Regenerative glutamate release by presynaptic NMDA receptors contributes to spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33 (10):1582-1594.

8. Anhang

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Tabellarische Darstellung der Tierzahlen n und deren Verteilung auf die verschiedenen Gruppen.....	28
Tab. 3.2: Tabellarische Darstellung der Zellalter der IdU ⁺ -Zellen der beiden Projekte zu Beginn der Vortest (OF, ONR, LNR), zu Beginn des MWM sowie das Alter zum Zeitpunkt der Perfusion.....	29

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Projektdesigns und Projektablaufs.	30
Abb. 3.2 Darstellung des chirurgischen Eingriffs und der Messung.....	32
Abb. 3.3 Beispiele IdU ⁺ -Zellen im Gyrus dentatus der Maus.....	40
Abb. 4.1 Auswertung der IdU/NeuN ⁺ -Zellen bei Tieren mit Verhaltenstests (Projekt 1).....	44
Abb. 4.2 Auswertung der IdU/NeuN ⁺ -Zellen bei Tieren ohne Verhaltenstests (Projekt 2).....	45
Abb. 4.3 Vergleich der IdU/NeuN ⁺ -Zellen zwischen Projekt 1 (Tiere mit Verhaltenstests) und Projekt 2 (Tiere ohne Verhaltenstests).....	46
Abb. 4.4 Auswertung der Zif268/IdU/NeuN ⁺ -Zellen bei Tieren mit Verhaltenstests (Projekt 1).....	48
Abb. 4.5 Auswertung der Zif268/IdU/NeuN ⁺ -Zellen bei Tieren ohne Verhaltenstests (Projekt 2)	49
Abb. 4.6 Vergleich der Zif268/IdU/NeuN ⁺ -Zellen zwischen Projekt 1 (Tiere mit Verhaltenstests) und Projekt 2 (Tiere ohne Verhaltenstests).....	51

Danksagung

Mein Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden, sowie meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen, die mich und meine wissenschaftliche Tätigkeit unterstützt haben.

Herrn Professor Otto Witte, Direktor des Instituts für Neurologie des Universitätsklinikums Jena, danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Anja Urbach, welche mich während meiner gesamten wissenschaftlichen Tätigkeit in Jena begleitet hat. Weiterhin danke ich Eileen Baum, ohne deren Vorarbeit und Mithilfe das vorliegende Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Mein tiefster Dank gebührt auch meiner Partnerin Stefanie, welche mir immer ermutigend zur Seite stand, und ohne die diese Arbeit so nicht entstanden wäre.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. Otto W. Witte, Dr. rer. nat. Anja Urbach und Eileen Baum,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, 18.06.2019

Falko Braun